



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ  
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ – ВАРНА  
ФАКУЛТЕТ ПО ФАРМАЦИЯ  
КАТЕДРА ПО БИОХИМИЯ,  
МОЛЕКУЛНА МЕДИЦИНА И НУТРИГЕНОМИКА**

**Данаил Василев Павлов**

**ПРОУЧВАНЕ НА АНТИОКСИДАНТНОТО,  
ПРОТИВОВЪЗПАЛИТЕЛНО И ПРОТИВОДИАБЕТНО  
ДЕЙСТВИЕ НА ЕКСТРАКТИ ОТ *COTINUS COGGYGRIA* В  
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛИ С ОПИТНИ ЖИВОТНИ И  
КЛЕТЪЧНИ КУЛТУРИ**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

на дисертационен труд за присъждане на образователната и  
научна степен „доктор“ по научна специалност 01.06.10.  
Биохимия

**Научни ръководители:**

проф. Диана Георгиева Иванова, дбн  
доц. д-р Стефка Василева Вълчева – Кузманова, дмн

**Варна, 2015**

*Дисертационният труд е обсъден на заседание на разширен катедрен съвет на Катедрата по биохимия, молекулярна медицина и нутригеномика при Медицински университет – Варна, състояло се на 28 ноември 2014 г., и е насочен за публична защита пред Научно жури в състав:*

- 1. проф. Диана Иванова, дбн – председател (становище)*
- 2. проф. Марияна Филипова-Маринова, дбн (становище)*
- 3. проф. Татяна Влайкова, дб (рецензия)*
- 4. доц. Татяна Янкова, дб (становище)*
- 5. доц. Бистра Калчева, дм (рецензия)*

*Дисертационният труд съдържа общо 139 страници, онагледен е със 63 фигури и 6 таблици. Книгописът включва 248 заглавия, от които 22 на кирилица и 226 на латиница.*

*Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 23.03.2015 г. от 14:00 ч. във III аудитория на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.*

*Материалите по защитата са публикувани на интернет-страницата на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.*

## СЪДЪРЖАНИЕ

|   |    |
|---|----|
| СПИСЪК на често използваните съкращения.....  | 5  |
| I. ВЪВЕДЕНИЕ.....   | 6  |
| II. ЦЕЛ.....  | 9  |
| III. ЗАДАЧИ.....  | 9  |
| IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....   | 10 |
| 1. Растителен материал и приготвяне на екстракти .....  | 10 |
| 2. Измерване концентрацията на полифеноли .....   | 11 |
| 3. Определяне на антиоксидантна активност .....   | 11 |
| 4. Хроматографски анализи .....   | 11 |
| 5. Клетъчни линии и субкултивиране на клетъчни<br>култури.....  | 12 |
| 6. МТТ тест за цитотоксичност и схеми за третиране на<br>клетъчни култури .....   | 12 |
| 7. Дизайн на моделите с експериментални животни ....  | 13 |
| 8. Измерване на биохимични показатели .....   | 15 |
| 9. Определяне нивата на генна експресия .....   | 16 |
| 10. Хистопатологична оценка .....   | 17 |
| 11. Статистическа обработка и графично представяне на<br>данните .....  | 18 |
| 12. Използвани реактиви .....   | 18 |
| V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ  |    |
| <i>Качествени и количествени фитохимични анализи</i>  |    |
| 1. Разделяне, идентифициране и количествено<br>измерване на главните полифеноли в извлекци от<br>листа и дървесина на смрадлика чрез<br>високоэффективна течна хроматография<br>(HPLC)..... | 18 |
| 2. Фракциониране и пречистване на водно-етанолен<br>извлек от дървесина на смрадлика чрез<br>високоэффективна противоточна хроматография<br>(HPLC).....                                     | 21 |
| 3. Измерване концентрацията на тотални полифеноли и<br>определяне на <i>in vitro</i> антиоксидантната активност<br>на екстракти от листа и дървесина на <i>C. coggygia</i> ...              | 23 |

*Тестове за токсичност*

|   |    |
|---|----|
| 4. Провеждане на МТТ тест за цитотоксичност на извлекци от <i>S. cogygia</i> върху клетъчни култури: 3T3-L1 (миши преадипоцити) и J774A.1 (миши макрофаги)..... | 28 |
| 5. Третиране на мъжки <i>Wistar</i> плъхове в модел на субхронична токсичност (30 дни).....   | 31 |
| <i>Биологични ефекти на екстракти от смрадлика</i>  |    |
| 6. Модел на индометацин-индуцирана стомашна улцерогенеза .....  | 39 |
| 7. Модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност .....   | 45 |
| 8. Модел на карагенан-индуцирано възпаление на задна лапа на плъх .....   | 52 |
| 9. Анализ на експресията на гени за адипонектин и PPAR $\gamma$ .....   | 54 |
| VI. ИЗВОДИ.....   | 57 |
| VII. ПРИНОСИ.....   | 59 |
| VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....  | 60 |
| IX. СПИСЪК НА УЧАСТИЯТА В НАУЧНИ ФОРУМИ С РЕЗУЛТАТИ ОТ ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....   | 61 |

## СПИСЪК НА ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

АОА – антиоксидантна активност  
АКФ – активни кислородни форми  
ВИЛС – воден извлек от листа на смрадлика (*Cotinus coggygia*)  
ДНК – дезоксирибонуклеинова/и киселина/и  
ЕИДС – 60:40 водно-етанолен извлек от дървесина на смрадлика (*Cotinus coggygia*)  
МДА – малонов диалдехид = МДА  
НАДФН – никотинамидадениндинуклеотид фосфат, редуцирана форма  
ОПС – общо полифенолно съдържание  
РНК – рибонуклеинова/и киселина/и  
ALT – alanine transaminase (аланин аминотрансфераза) = АлАТ  
ALP – alkaline phosphatase (алкална фосфатаза) = АФ  
AST – aspartate transaminase (аспартат аминотрансфераза) = АсАТ  
QE – quercetin equivalents (кверцетинови еквиваленти)  
SH – сулфхидрилен (тиолов)  
TAG – триацилглицероли (триглицериди) = ТАГ  
UA – uric acid (пикочна киселина) = ПК  
UAE – uric acid equivalents (еквиваленти пикочна киселина)

## I. Въведение

Лечението с билки е известно на човека още от най-дълбока древност в Асирия, Шумер, Вавилон, Китай, Индия, Тибет и впоследствие – Египет, Елада и Рим. От бащата на съвременната медицина Авицена е известна сентенцията: “Лекарят има три оръжия: слово, растение, нож.” Когато се анализират причините за повишения интерес към лечебните растения у нас, заслужено място трябва да се отдаде на богатството и дълбоките традиции на българската фитотерапия, която в голяма степен включва и принципите на арабската народна медицина, придобила голяма популярност на Балканския полуостров по време на Османското робство.

Медицинските растения заемат все по-значимо място в лечението и профилактиката на редица заболявания – самостоятелно или като допълнителни средства към конвенционалната терапия. По данни на Световната здравна организация, около 80% от всички хора по света използват лечебни растения, като техният брой непрекъснато нараства. В много случаи комбинацията от фитохимичните съставки на растението има по-ефективно лечебно действие, отколкото когато се използват изолираните от него органични молекули. Това обяснява защо въздействието на много лечебни растения – напр. лудо биле, кестен, жълт кантарион, чесън, чай и кафе, се различава от изолираните от тях съответно атропин, есцин, хиперицин, алицин, теофилин и кофеин. От друга страна, фитохимията и фармакогнозията имат за основна задача екстрахирането на полезните вещества от лекарствените растения в чист вид, но при това е възможно да се изгубят други непроучени такива, които биха имали благоприятно въздействие върху човешкото здраве.

Разширяващите се научни знания за връзката между химичните компоненти на лечебните растения и конкретната им биологична активност засилват доверието към тях и мотивират ползата от тяхната употреба. Нарастват връзките между съществуващите емпирични данни от народната медицина и възможностите на съвременните

медикобиологични и клинични изследвания. Нараства и необходимостта от точна научна информация за ползата от лечебните растения и получените от тях продукти, както и за рисковете от некомпетентното им използване.

Системното и задълбочено проучване опита на българската народна медицина включва анализи на химичния състав, токсичността и биологичната активност на растящите у нас лечебни растения, както и научна обосновка на възможностите за тяхното практическо използване. Немалко лекарства, като напр. нивалин, леонурич, винкапан, антралакс и розалин, са приготвени от български билки.

Едно от най-популярните лечебни растения в България е обикновената евроазиатска смрадлика (*Cotinus coggygia* Scop.). В традиционната българска народна медицина листата от смрадлика (*Foliorum Cotini coggygiae*) са често употребявана дрога, декоктите от която имат противовъзпалително и хемостатично действие и се използват предимно за промивки на устната кухина при зъбобол и гингивит, както и за компреси при гнойни рани, циреи и отоци, младежки пъпки. Популярно е използването на бани след изгаряне, при хемороиди и бяло течение. Извлеките от смрадлика се използват основно външно – върху кожата и лигавиците, тъй като растението се счита за отровно. В народната медицина има много оскъдни съобщения за вътрешното използване на извлеките от растението чрез перорално приложение: в българската – срещу диария, язва на стомаха, задух, бъбречни заболявания, хемороиди, бяло течение и трипер; в турската – при диабет, нефрит, антракс, астма и сърдечно-съдови заболявания; в китайската – за превенция и лечение на коронарната болест на сърцето, инфаркта на миокарда и церебралната тромбоза.

Изследванията на химичния състав на растението показват, че листата имат високо съдържание на фенолни съединения, като свободна галова киселина и галотанини. За някои от установените в екстракти от *C. coggygia* биологичноактивни вещества има добре документирана антиоксидантна активност относно залавянето на активните

кислородни форми, инхибирането на инициацията и пропагацията на липидната пероксидация, повишаването на активността на антиоксидантните ензими. Тази активност дава основание традиционно използваният воден извлек от листата на смрадлика да се изследва за протективен ефект в *in vivo* модели на оксидативен стрес.

В научната литература липсват данни за фитохимичния състав и биологичната активност на 40% водно-етанолен извлек от дървесината на смрадлика. Досега не е провеждано изследване на токсичността и/или терапевтичния потенциал на дървесината от смрадлика, използвана сравнително рядко при оцветяването на високоалкохолни домашни напитки, по отношение антиоксидантните свойства на извлеките и съдържащите се в тях флавоноиди. Това дава основание водно-етанолният извлек от дървесина на *C. coggygria* също да бъде изследван в *in vivo* модели на оксидативен стрес.

На база известното от литературата съдържание на биологичноактивни вещества в растението, може да се очаква, че извлеките ще проявят благоприятен протективен ефект в експерименталните модели с опитни животни и клетъчни култури, който следва да се верифицира чрез изследване на широк кръг от биохимични показатели, както и чрез хистопатологични и молекулярно-биологични анализи.

Изследванията в посочените аспекти биха допринесли за разширяване познанията за биологичните ефекти на извлеките от смрадлика и биха дали научна обосновка на тяхното традиционно използване в балканската, анадолската и китайската народната медицина, с което ще допринесат за разширяване на показанията за тяхното използване в официалната медицина. Данните от експерименталните проучвания могат да послужат като предпоставка за планиране на клинични изпитвания при хора. По този начин, изследванията биха позволили да се изяснят противоречивите данни между докладваните в популярната литература съобщения, вярванията и традициите на населението и научните публикации.



## II. ЦЕЛ

Да се изследват антиоксидантните, противовъзпалителни и противодиабетни свойства на смрадликата (*Cotinus coggygria*) чрез:

- 1) Определяне на фитохимичния състав и антиоксидантната активност на екстракти от листа и дървесина;
- 2) Оценка на токсичността на екстрактите върху клетъчни култури и експериментални животни;
- 3) Установяване на биологичната активност на екстрактите в модели на оксидативен стрес и възпаление.

## III. ЗАДАЧИ

*Провеждане на качествени и количествени фитохимични анализи*

1. Разделяне, идентифициране и количествено измерване на главните полифеноли в извлекци от листа и дървесина на смрадлика чрез високоефективна течна хроматография (HPLC);
2. Фракциониране и пречистване на извлекците чрез високоефективна противоточна хроматография (HPLC);
3. Измерване концентрацията на тотални полифеноли и определяне на *in vitro* антиоксидантната активност на извлекците от *C. coggygria*;

*Извършване на тестове за токсичност*

4. Провеждане на МТТ тест за цитотоксичност на извлекци от *C. coggygria* върху клетъчни култури: 3T3-L1 (миши преадипоцити) и J774A.1 (миши макрофаги);
5. Третиране на мъжки *Wistar* плъхове с три водни извлека от листа и водно-етанолен извлек от дървесина на смрадлика в модел на субхронична токсичност (30 дни);

### *Установяване на биологични ефекти*

6. Проучване на *in vivo* антиоксидантните свойства на извлеките от смрадлика в:
  - 6.1. Модел на индометацин-индуцирана стомашна улцерогенеза при плъхове;
  - 6.2. Модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност при плъхове;
7. Оценка на противовъзпалителните свойства на извлеките от смрадлика в модел на карагенан-индуцирано възпаление на задната лапа при плъхове;
8. Изследване на противодиабетния потенциал на смрадликата чрез анализ на експресията на гени за адипонектин и PPAR $\gamma$  при 3T3-L1 миши преадипоцити.

## **IV. Материали и методи**

### **1. Растителен материал и приготвяне на екстракти**

**Извлек от листа.** Приготвянето на водния извлек от листа на смрадлика (ВИЛС) става като 4 g от листата на суха дрога (*Foliorum Cotini coggygriae*) се запарват за 10 min със 100 ml вряща вода (4/100 ВИЛС), след което се филтрат и с разреждане 2 и 4 пъти с дестилирана вода се получават съответно 2/100 ВИЛС и 1/100 ВИЛС.

**Извлек от дървесина.** Изходният материал за приготвянето на водно-етанолните извлекци от дървесина е суха сърцевина на стъблото на дървесен екземпляр от смрадлика (*Caulis Cotini coggygriae*). За *in vivo* експериментите е използван извлек от 2 g дървесина, престояла в 1L 40% Етанол за 20 дни, който непосредствено преди третирането е доведен до 20% с вода.

**Фракциониране.** При приготвянето на фракциите от листа на смрадлика е следвана стандартна процедура за екстракция: суха и фино смляна дрога се залива с абсолютен метанол в съотношение 1:20 и се екстрахира в ултразвукова вана при стайна температура в продължение на 30 min.

## 2. Измерване концентрацията на полифеноли

Общото полифенолно съдържание (ОПС) е определяно посредством спектрофотометричния метод на Singleton and Rossi (1965). Концентрацията на полифенолите е представена като mM еквиваленти кверцетин (QE).

## 3. Определяне на антиоксидантна активност

Антиоксидантната активност (АОА) е определяна чрез ABTS [2,2'-азинобис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонова киселина)] катион радикал обезцветяващ метод (Re et al., 1999). Данните за АОА са представени като mM еквиваленти пикочна киселина (mM UAE).

## 4. Хроматографски анализи

Качественият и количествен анализ на водния извлек от листата и водно-етанолния извлек от дървесината на смрадлика е извършен със система за високоефективна течна хроматография (HPLC) на Waters, модел Separations Module 2695 със светодиоден UV-DAD детектор също на Waters, модел 2996 ( $\lambda$  210 – 400 nm); Хроматографска колона: 5  $\mu$ m SunFire C18 (150  $\times$  4.6 mm); Работна температура: 40°C; Налягане: 1200 psi; Проба: 10  $\mu$ l; Софтуер: Empower.

Системата от подвижни фази е съставена от 0.01% трифлуорооцетна киселина и ацетонитрил при градиент:

| t (min) | A<br>(0.01% TFA) | B<br>(ацетонитрил) | Дебит<br>(ml/min) |
|---------|------------------|--------------------|-------------------|
| 0       | 98               | 2                  | 1                 |
| 20      | 78               | 22                 | 1                 |
| 35      | 60               | 40                 | 1                 |
| 36      | 0                | 100                | 1                 |
| 37      | 98               | 2                  | 1                 |
| 40      | 98               | 2                  | 1                 |

Количественото определяне на съдържанието на полифеноли е извършено с HPLC стандартна калибровъчна крива за всеки от установените главни полифеноли.

Системата за високоефективна противоточна хроматография (HPLC) включва две HPLC системи на Agilent Technologies Series 1200, които се използват за помпене на подвижната фаза и фракциониране на извлеката, и колона Dynamic Extractions Mini (73 ml), обороти: 600 rpm, работна температура: 40°C, дебит за внасяне на подвижната фаза: 1 ml/min, налягане 40 bar, време за фракциониране: 80 min. За подвижна фаза е използвана долната фаза от селектираната с HPLC анализ система от разтворители (хексан, етил ацетат, метанол, вода). За стационарна фаза е използвана горната фаза от същата система (хроматографията е обратнофазова). Инжектирана проба: 3,5 ml; Отчитане: при  $\lambda=255, 280$  и  $390$  nm; Софтуер: OpenLab.

## 5. Клетъчни линии

3T3-L1 е непрекъснат субклон на 3T3 (Swiss albino) (*Mus musculus*), получен чрез клонална изолация. Клетките са недиференцирани и са с фибробластна морфология.

J744A.1 е моноцитно-макрофажна миша (*Mus musculus*) клетъчна линия. Клетките са с макрофажна морфология и са диференцирани.

## 6. МТТ тест за цитотоксичност и схеми на третиране на клетъчни култури

Тестът за цитотоксичност се извършва по метода на Mosmann (1983) с някои модификации. Клетките се посяват в 6-ямкови фласки с гъстота  $2 \times 10^5$  кл./ямка, с общ обем на инокулума 2 мл в хранителна среда за субкултивиране. При третирането се използва съответната хранителна среда. Всяко третиране на клетъчната култура е предшествано от отстраняване на предходната хранителна среда.

**Схема на третиране 0-ев час:** посяване на клетъчната култура; **24-ти час:** третиране с растителен екстракт и контрола; **44-ти час:** МТТ тест.

## **7. Дизайн на моделите с експериментални животни**

**Експериментални животни.** Използват се мъжки плъхове, порода *Wistar*, с изходно тегло 200-250 g, отглеждани във Вивариума на МУ-Варна при температура 23-25°C, 12 часов цикъл на светлина/тъмнина. На животните се осигурява постоянен достъп до вода и храна (стандартна диета, включваща 50% скорбяла, 20% протеин, 4.5% мазнини, 5% целулоза, стандартна смес от витамини и минерали).

**Етични съображения.** Всички процедури, свързани с отглеждането и третирането на опитните животни е в съответствие с международните норми, които са възприети в България и МУ-Варна. За провеждане на опитите от НВМС е получено Разрешително за използване на животни в опити с Рег. № 13 валидно до 05.11.2015 год, Протокол № 18/17.10.2010 от Комисия по етика към животните при НВМС.

Третирането на мъжки *Wistar* плъхове с извлекци от листа и дървесина на смрадлика се извършва в четири експериментални модела:

### **7.1. Модел на субхронична токсичност (n=60);**

Експериментални групи: (1) Контрола Вода (n=10); (2) 1/100 ВИЛС (n=10); (3) 2/100 ВИЛС (n=10); (4) 4/100 ВИЛС (n=10); (5) Контрола 20% Етанол (n=10); (6) 1/1000 ЕИДС (n=10); Начин на приложение на извлекците: Интрагастрално чрез сондиране; Обем: 10 ml/kg; Продължителност на третирането: 30 дни; Пробовземане на кръв: 4 часа след последното третиране под етерна наркоза от подезичната вена; Пробовземане на органи: След декапитация се вземат черен дроб, бъбрек и мозък; Измервани биохимични показатели в серум: АсАТ, АлАТ, АФ, урея, креатинин, общи тиоли, МДА, пикочна киселина, ТАГ; Измервани показатели в органи: Общи тиоли, МДА и пикочна киселина в хомогенати от черен дроб, бъбрек и мозък. ТАГ се измерват само в черен дроб.

## **7.2. Модел на индометацин (Индо)-индуцирана улцерогенеза (n=64);**

Експериментални групи: (1) Контрола Вода (n=8); (2) Вода+Индо (n=8); (3) 1/100 ВИЛС+Индо (n=8); (4) 2/100 ВИЛС+Индо (n=8); (5) 4/100 ВИЛС+Индо (n=8); (6) Контрола 20% Етанол (n=8); (7) 20% Етанол+Индо (n=8); (8) 1/1000 ЕИДС+Индо (n=8); Начин на приложение на извлеките: Интрагастрално чрез сондиране; Обем: 10 ml/kg като претретиране; Продължителност на претретирането: 3 дни; Начин на приложение на индометацин: интрагастрално чрез сондиране, 1 час след претретирането, на гладно, еднократно; Доза: 100 mg/kg, разтворен в Tween 80; Пробовземане на кръв: 4 часа след третирането с индометацин, под етерна наркоза от подезичната вена; Пробовземане на стомах: след декапитация; Измервани показатели в серум: Общи тиоли, МДА и пикочна киселина; Измервани показатели в стомах: Брой и площ на язвените дефекти; АФ, МДА и пикочна киселина в хомогенат.

## **7.3. Модел на парацетамол (П)-индуцирана хепатотоксичност (n=64);**

Експериментални групи: (1) Контрола Вода (n=8); (2) Вода+П (n=8); (3) 1/100 ВИЛС+П (n=8); (4) 2/100 ВИЛС+П (n=8); (5) 4/100 ВИЛС+П (n=8); (6) Контрола 20% Етанол (n=8); (7) 20% Етанол+П (n=8); (8) 1/1000 ЕИДС+П (n=8); Начин на приложение на извлеките: Интрагастрално чрез сондиране; Обем: 10 ml/kg като претретиране; Продължителност на третирането: 9 дни; Начин на приложение на парацетамол: Интраперитонеално, 1 час след претретирането, еднократно на 7-ми ден, на гладно; Доза: 1 g/kg, разтворен в Tween 80; Пробовземане на кръв: 2 часа след последното претретиране, под етерна наркоза от подезичната вена; Пробовземане на черен дроб: след декапитация; Измервани показатели в серум: АсАТ, АлАТ, АФ, общи тиоли, МДА, пикочна киселина и ТАГ; Измервани показатели в черен дроб: ТАГ и пикочна киселина.

#### **7.4. Модел на карагенан (К)-индуцирано възпаление на задната лапа (n=64);**

Експериментални групи: (1) Негативна Контрола Вода (n=8); (2) Контрола Вода+К (n=8); (3) 1/100 ВИЛС+К (n=8); (4) 2/100 ВИЛС+К (n=8); (5) 4/100 ВИЛС+К (n=8); (6) Негативна Контрола 20% Етанол (n=8); (7) Контрола 20% Етанол+К (n=8); (8) 1/1000 ЕИДС+К (n=8); Начин на приложение на извлеките: Интрагастрално чрез сондиране; Обем: 10 ml/kg като претретиране; Продължителност на претретирането: 15 дни; Начин на приложение на карагенан: субплантарно, в лявата задна лапа, 1 час след претретирането; Доза: 1 mg като 100  $\mu$ L прясно приготвен 1% w/v разтвор в 0.9% физиологичен разтвор; Негативните контроли се инжектират с 0.9% физиологичен разтвор; Пробовземане на оточната лапа: след декапитация; Апарат: Цифров воден плетизмометър LE7500 Panlab, Барселона (Испания); Измервани показатели:

Оток на лапата (%):

$[(V_S - V_0)/V_0] \times 100$ , където:

$V_S$  – среден обем на отока на лапата, измерен 1/2, 1, 2, 3, 4 и 5 часа след инжектирането на карагенан

$V_0$  – среден начален обем на лапата

Инхибиция на отока на лапата (%):

$[(V_C - V_{PT})/V_C] \times 100$ , където:

$V_C$  – среден обем на отока на лапата при контролната група

$V_{PT}$  – среден обем на отока на лапата за всяка претретирана група

#### **8. Измерване на биохимични показатели**

**Отделяне на кръвен серум.** Кръвта се събира директно от подезичната вена в хепаринизирани вакутейнери, които се центрофугират при 2000 rpm за 10 min. Серумът се съхранява при 20°C за около 3 часа, докато се извършат всички биохимични анализи в деня на пробовземането.

**Хомогенизиране и съхранение на органи.** Един грам от всеки изследван орган се хомогенизира с хомогенизатор на Potter в 10 ml 50mM фосфатен буфер, съдържащ 0,1 mM EDTA, за 2-3 min при 4000 rpm. За хомогенизирането на стомах са използвани 5 ml за грам. Полученият хомогенат се центрофугира при 3000 rpm, 10 min, 4°C за отделяне на грубата утайка. Супернатантата допълнително се центрофугира при 10000 rpm, 10 min, 4°C.

**Определяне концентрацията на тотални тиоли.** Концентрацията на тотални тиоли в серум и хомогенати е определена чрез адаптиран по Ellman (1959) метод. Като стандарт се използва разтвор на редуциран глутатион, разтворен в 5 mM PBS (pH=7,4).

**Определяне концентрацията на малонов диалдехид.** Концентрацията на малонов диалдехид (МДА) е определяна спектрофотометрично в кръвен серум и хомогенати по метода на Porter et al. (1976).

**Биохимични показатели, измервани с набор от реактиви** (китове): серумна активност на аминотрансферазите АсАТ (AST, GOT) и АлАТ (ALT, GPT); Активност на АФ (ALP) в кръвен серум и хомогенат от стомах; Концентрации на урея и креатинин в серум; Концентрациите на пикочна киселина и триглицериди в кръвен серум и хомогенат от черен дроб.

## **9. Определяне нивото на генна експресия**

За определяне нивото на генна експресия на избрани гени в клетъчни култури е използван двустъпков количествен Real-Time PCR.

## **Изолиране на РНК**

*Изолиране на РНК от клетки в култура.* Изолирането на РНК от клетки е извършено с помощта на TriReagent (Ambion, USA), като лабораторният протокол следва указанията на производителя. Количеството на нуклеиновата киселина е оценявано спектрофотометрично.



*Обратна транскрипция – RT-PCR.* РНК (0,1-5 µg) е обратно транскрибирана с помощта на Revertaid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, съдържащ олиго (dT)18 праймер и RevertAid™ обратна транскриптаза.

*Количествен Real Time PCR.* Амплификацията на кДНК в реално време е извършена с ген-специфични праймери. За конструирането им и на ФБП е използван Real-Time PCR gene expression Design Tool; синтезирани от Sigma-Aldrich и Integrated DNA Technologies. Като матрица е използвана 0,01-0,1µg кДНК; крайна концентрация на праймерите - 300nM, а на ФБП (5'FAM-3'Tamra) – 100nM. Анализът е извършен на ABI Prism 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Краен обем на реакционната смес - 5 µl; 40 цикъла: активиране на ензима и денатурация - 95°C/10 min; амплификация - 95°C/15 sec, анилинг - 60°C/1 min. Стойностите на генната експресия са изчислени по  $\Delta\Delta C_t$  метода (Livak and Schmittgen, 2001) и са изразени в относителни единици, в сравнение с нетретираната контрола, при която нивото на експресия на анализирания ген се приема за единица.

## **10. Хистопатологична оценка**

**Отчитане на промени в черния дроб, бъбреците и задна лапа от плъх.** Материал от черен дроб, бъбрек и цялата задна лапа се фиксира в 10% неутрален формалин и след съответна рутинна обработка се включва в парафин. Срези с дебелина 5 µm са оцветени с хемалаун и еозин и са изследвани светлинно микроскопски. В черен дроб се преброяват апоптотичните клетки и неспецифичните грануломи в 10 препарата от изследваната тъкан.

**Отчитане на стомашни язви** - макроскопски с помощта на лупа (x10); всички лигавични дефекти се означават като язви, независимо от различната им степен на изява, а 5 броя петехиални кръвоизливи се считат за язва с размер от 1 mm<sup>2</sup>. Материал от стомаха се фиксира в 10% неутрален формалин и след съответна рутинна обработка се включва в парафин. Срези с дебелина 3 µm са оцветени с хематоксилин и еозин и са изследвани светлинно микроскопски.

## **11. Статистическа обработка и графично представяне на данните**

Статистическата обработка на данните е извършена с помощта на еднофакторен вариационен анализ (one-way ANOVA), последван от Dunnett's Multiple Comparison Post Test. Две независими групи са сравнявани със Student's t-test. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ SEM. Статистическата достоверност се приема при  $p < 0.05$ . За статистическия анализ и графичното представяне на резултатите е използвана статистическата програма GraphPadPrism (ver. 6.00, GraphPad Software Inc.).

## **12. Използвани реактиви**

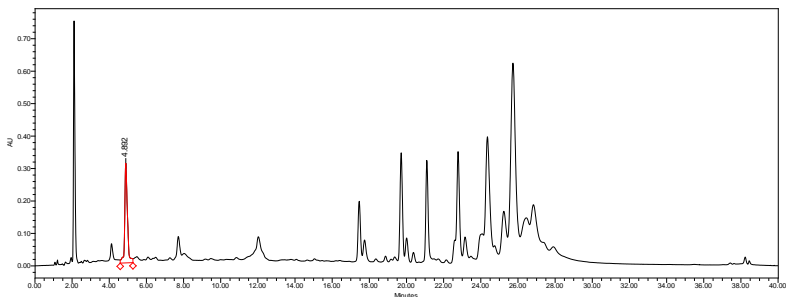
Всички използвани химикали са с качество „за анализ“, произведени от фирмите: Merck, Fluka, Sigma-Aldrich, Applichem, Lachner, Scharlau. Хранителни среди, разтвори на трипсин, пеницилин и стрептомицин: от Cambrex; консумативи за работа с клетъчни култури (фласки, пипети, скрепъри): от greiner-bio-one; китове за синтез на кДНК и Real Time PCR: от Fermentas; Tri-Reagent: от AmBion; праймери и сонди: от Sigma-Aldrich и Integrated DNA Technologies; клетъчни култури: от ATCC.

## **V. Резултати и обсъждане**

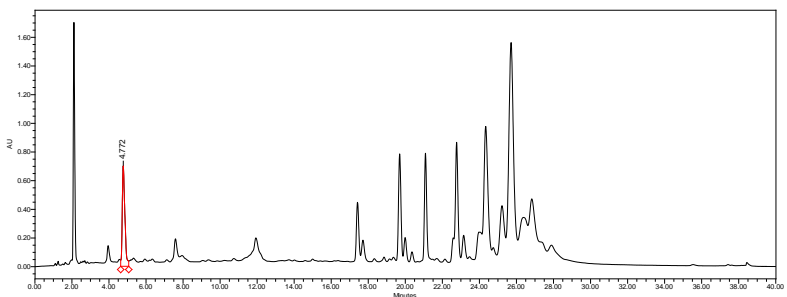
### ***Качествени и количествени фитохимични анализи***

**1. Разделяне, идентифициране и количествено измерване на главните полифеноли в извлекци от листа и дървесина на смрадлика чрез високоефективна течна хроматография (HPLC)**

На фиг. 1 и 2 са представени хроматограмите от HPLC анализите на два водни извлекци от листа на смрадлика – 1/100 и 2/100 ВИЛС. Установен е хроматографски пик за галовата киселина (маркиран в червено, между 4<sup>та</sup> и 5<sup>та</sup> минута от времетраенето на анализа).



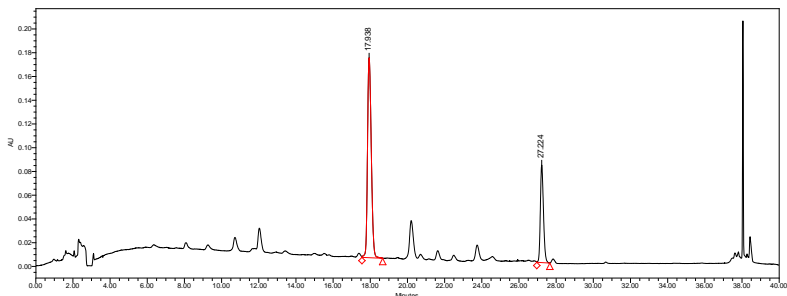
**Фигура 1.** HPLC-DAD хроматограма на 1/100 ВИС



**Фигура 2.** HPLC-DAD хроматограма на 2/100 ВИС

С HPLC е изготвена калибровъчна крива, чрез която е установена концентрацията на свободна галова киселина, съответно 47.97 mg/L за 1/100 ВИС и 98.36 mg/L за 2/100 ВИС.

На фиг. 3 е представена хроматограмата от HPLC анализа на 40% водно-etanoлен извлек от дървесина на смрадлика (1/500 ЕИДС). Установени са два хроматографски пика за фустин (маркиран в червено, между 17<sup>та</sup> и 18<sup>та</sup> минута от времетраенето на анализа) и сулфуретин (между 27<sup>та</sup> и 28<sup>та</sup> минута от времетраенето на анализа).



**Фигура 3.** HPLC-DAD хроматограма на 1/500 ЕИДС

След построяването на съответните стандартни калибровъчни криви е установено, че концентрацията на фустин в 1/500 ЕИДС е 52.27 mg/L, а тази на сулфуретин – 14.20 mg/L.

**Обсъждане.** При хроматографския анализ с HPLC е потвърдено добре известното от литературата наличие на свободна галова киселина във ВИЛС. Налице е несъответствие с българските литературни източници (Ланджев, 2010) относно наличието на 3% свободна галова киселина в листата от смрадлика, тъй като HPLC анализа за 1/100 ВИЛС показва, че свободната галова киселина представлява около 0.5 % от сухото тегло на растителната маса, подложена на екстрахиране с дестилирана вода. Най-вероятно, разликата се дължи на отчитането на съдържанието на галотанини във водния извлек от листата, съставът на които е добре известен от публикацията на Кемертелидзе и съавт. (2007). Това са метилгалат, диметилгалат, триметилгалат, тетрагалоил глюкоза и пентагалоил глюкоза.

При HPLC анализа на 1/500 ЕИДС не са доказани съобщаваните в научната литература физетин и мирицетин, като главни фитохимични съставки на метаноловите екстракти от дървесина на смрадлика (Antal et al., 2010; Matic et al., 2013). Получените данни за качествения състав на екстракта от дървесина на смрадлика в общи линии съответстват на сведението на Antal et al. (2010) за

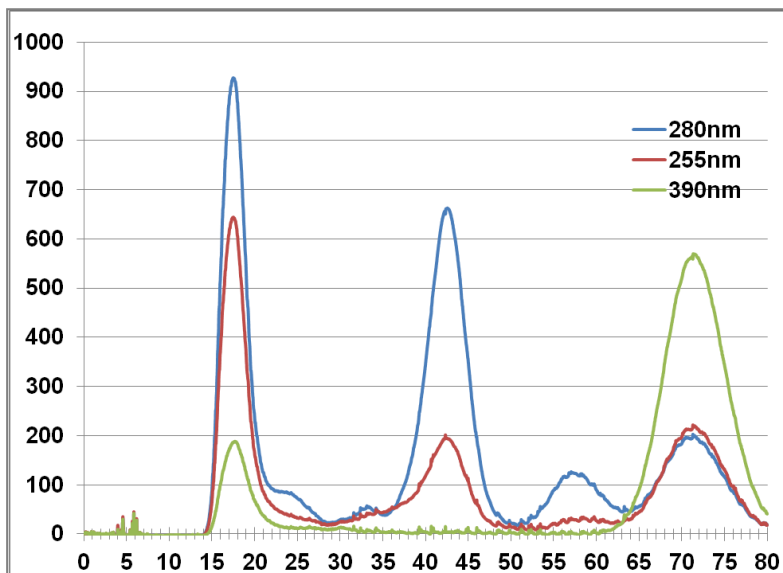
преобладаващите съставки фустин и сулфуретин, но в 1/500 ЕИДС не е установен третия основен компонент – физетин.

Минималната разлика в полярността на метанола и етанола, както и разликите в качествения и количествения състав на главните компоненти на екстрактите от дървесина на смрадлика, предполагат че по-вероятната причина за това несъответствие е различният метаболизъм на аминокиселините фенилаланин и тирозин, които са източници на полифеноли за растителната клетка. В този смисъл, от съществено значение се явяват почвените условия, които най-вероятно са различни при екземплярите взети за анализ в Румъния и България. Това обяснява и разликите в състава на анализиранияте проби от дървесина от Сърбия (Matic et al., 2013) – преобладава мирицетин, който не е доказан в настоящото изследване за 1/500 ЕИДС.

Поради ниската себестойност на стандарта галова киселина и наличните литературни данни за качествения състав на галотанините във воден извлек от листа на смрадлика, е избрано на фракциониране с НРССС да бъде подложен единствено ЕИДС, тъй като за главните му фитохимични компоненти фустин и сулфуретин е открито само едно сведение за фракциониране с високоефективна противоточна хроматография за екстракт от вида *Rhus verniciflua*, също от семейство Anacardiaceae (Choi et al., 2012).

## **2. Фракциониране и пречистване на водно-етанолен извлек от дървесина на смрадлика чрез високоефективна противоточна хроматография (НРССС)**

При избора на подходяща двуфазна течно-течна система от разтворители, необходима за фракциониране и пречистване на компонентите на 1/500 ЕИДС с НРССС, е селектирана системата хексан, етил ацетат, метанол, вода при съотношение 1/1/2,5/1. С НРССС е извършено успешно фракциониране на двата главни фитохимични компонента на ЕИДС – биофлавоноидите фустин и сулфуретин (фиг. 4).



**Фигура 4.** HPLC-UV хроматограма на 1/500 ЕИДС с разделяне на главните фитохимични съставки фустин (по средата) и сулфуретин (вдясно)

След пречистване на сбор от съответните фракции с HPLC при същия градиент на подвижната фаза, двете единични съставки са успешно изолирани в чист вид.

**Обсъждане.** Фракционирането на екстракти от смрадлика с високоефективна противоточна хроматография (HPLC) е извършено за първи път в световната изследователска практика. Като причина за отсъствието на физетин в анализирания ЕИДС може да се посочи невъзможността за качествено разделяне на близките по структура фустин и физетин при извършването на наличните в литературата хроматографски анализи на проби от дървесина на смрадлика. Фустинът (дихидрофизетин) е флаванол, който е субстрат на ензимите флаванол-3-диоксигеназа и флавонол синтаза, които го метаболизират до физетин в присъствието на  $\alpha$ -кетоглутарат и кислород. Ето защо, за по-голяма

прецизност, за нуждите на HPLC анализите, предхождащи фракционирането с HPLC, е тестван и стандарт на физетин, който е подложен на хроматографски анализ при същия градиент на подвижната фаза, използван при анализа на 1/500 ЕИДС. От друга страна, Antal et al. (2010) доказват с HPLC-MS и двата компонента (фустин и физетин), с което се потвърждава, че най-вероятната причина за несъответствието в качествения състав е различният метаболизъм на аминокиселините фенилаланин и тирозин, които са източници на полифеноли за растителната клетка. От особена важност се явяват почвените условия, които са различни при екземплярите, взети за анализ, съответно в Румъния и България.

### **3. Измерване концентрацията на тотални полифеноли и определяне на *in vitro* антиоксидантната активност на екстракти от листа и дървесина на *C. coggygia***

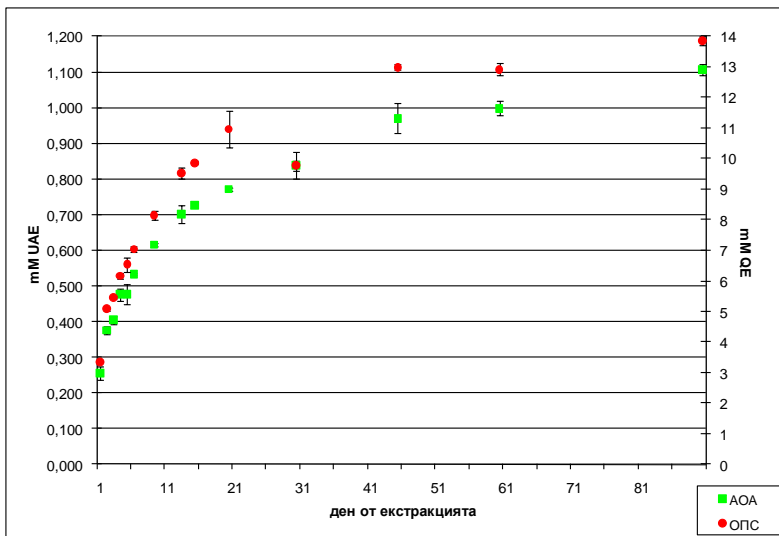
Резултатите за общото полифенолно съдържание (ОПС) и антиоксидантна активност (АОА) на изследваните екстракти са представено в табл. 1. С най-високи стойности за ОПС се отличава 4/100 ВИЛС, следван от 2/100 и 1/100 ВИЛС. При последните два извлека е налице правопрпорционално нарастване на ОПС и АОА с увеличаване съдържанието на растителната маса, подложена на екстракция. Такава пропорционална зависимост не е установена при 4/100 ВИЛС спрямо 2/100 ВИЛС. Измежду шестте фракции от листа на смрадлика, с най-високи стойности за ОПС и АОА се отличава етилацетатната фракция, следвана от тоталната метанолна и бутанолната фракции. Останалите три фракции са със значително по-ниски стойности за ОПС и АОА. Многократно по-ниски са и стойностите за ОПС на 5/100 40% водно-етанолен извлек от листа на смрадлика (ЕИЛС), но АОА за този извлек е близка до 2/100 ВИЛС. Сравнението на ОПС и АОА за двата 40% водно-етанолни извлека от дървесина на смрадлика (ЕИДС) показва по-високи стойности за пробата от необработена дървесина.

**Таблица 1.** Обобщение на резултатите от измерването на ОПС и АОА на изследваните екстракти от смрадлика (*Cotinus coggygia*)

| Екстракт  | Общо полифенолно съдържание (ОПС), mM QE |          | <i>In vitro</i> антиоксидантна активност (АОА) mM UAE |          |
|---|--|----------|---|----------|
| <b>Воден извлек от листа на смрадлика (ВИЛС)</b>                          |  |          |   |          |
| 1/100 ВИЛС  | 71.99±2.67                               | CV%=3.71 | 17.84±0.11  | CV%=0.62 |
| 2/100 ВИЛС  | 143.19±2.04                              | CV%=1.42 | 33.22±0.18  | CV%=0.55 |
| 4/100 ВИЛС  | 231.28±1.87                              | CV%=0.81 | 53.49±0.29  | CV%=0.54 |
| <b>Фракции от листа на смрадлика</b>                                      |  |          |   |          |
| Тотална метанолна   | 12.43±0.55                               | CV%=4.42 | 67.21±1.78  | CV%=2.65 |
| Петролиево-етерна   | 0.97±0.02                                | CV%=2.06 | 7.97±0.22   | CV%=2.76 |
| Хлороформна   | 1.59±0.06                                | CV%=3.77 | 0.89±0.03   | CV%=3.37 |
| Етилацетатна (ЕАФ)  | 22.25±1.03                               | CV%=4.63 | 136.25±3.23   | CV%=2.37 |
| Бутанолна   | 4.47±0.22                                | CV%=4.92 | 28.67±1.12  | CV%=3.91 |
| Водно-метанолна   | 1.41±0.05                                | CV%=3.55 | 6.01±0.21   | CV%=3.49 |
| <b>40% Водно-etanoлен извлек от листа на смрадлика (ЕИЛС)</b>             |  |          |   |          |
| 5/100 ЕИЛС  | 4.65±0.08                                | CV%=3.73 | 28.48±0.16  | CV%=2.11 |
| <b>40% Водно-etanoлен извлек от дървесина на смрадлика (ЕИДС), ден 20</b> |  |          |   |          |
| Необработена дървесина  | 10.96±0.59                               | CV%=5.35 | 0.77±0.01   | CV%=0.71 |
| Обработена дървесина  | 9.12±0.10                                | CV%=1.11 | 0.64±0.02   | CV%=3.11 |

На фиг. 5 са представени резултатите от проследяването на изменението в ОПС и АОА на 1/500 ЕИДС в продължение на 90 дни. Установено е, че линейното нарастване на ОПС и съответстващата му АОА спира около двадесетия ден. Получени са данни за изключително висока корелация между АОА и ОПС ( $r=0.98$ ).





**Фигура 5.** Сравнение в изменението на антиоксидантната активност (АОА) и общото полифенолно съдържание (ОПС) на извлек от необработена дървесина от смрадлика

**Обсъждане.** Получените резултати съответстват на известните в научната литература данни за високата *in vitro* антиоксидантна активност на водно-етанолния извлек от листата на смрадлика (ЕИЛС), като е установена положителна корелация на АОА с ОПС (Ivanova et al., 2005; Киселова-Кънева, 2011; Иванова, 2013). Други автори също докладват подобна висока АОА на водни и метанолови екстракти от листа на смрадлика, сравнима с тази на  $\alpha$ -токоферола (Кемертелидзе и съавт., 2007; Nikiforovic et al., 2010a). Като се има предвид високото съдържание на галова киселина и галотанини, може да се предположи, че АОА на екстрактите от листа на смрадлика се дължи на тези фенолни съединения.

Потвърдените данни за висока *in vitro* антиоксидантна активност дават достатъчно основание извлеките от листа на смрадлика да се изследват за токсичност и протективен ефект в *in vivo* модели с генериран оксидативен стрес при опитни

животни. Близките стойности за *in vitro* АОА на 2/100 ВИЛС и 5/100 ЕИЛС в сравнение със стойностите за общото полифенолно съдържание, демонстрират възможностите на водата като разтворител да извлича много повече полифеноли от растителните дроги, отколкото 40% етанол. Ето защо, поради установените значително по-високи стойности за ОПС, на качествен и количествен HPLC анализ са подложени именно ВИЛС, докато ЕИЛС е тестван за токсичност при *in vitro* МТТ тестовете при клетъчни култури, предвид възможността за използване на добре известния с цитотоксичността си 40% етанол като контролна група. Последното важи и за непроучения ЕИДС. При третирането на опитни животни в модел на субхронична токсичност, е избрано да се прилага ВИЛС, поради етнофармакологичните данни за токсичността на декоктите от листа на смрадлика, в сравнение с непроучения ЕИДС.

От изследваните три ВИЛС, най-близък до традиционната рецепта срещу язва на стомаха (Иванов и съавт., 1977) е 1/100 ВИЛС. В тази връзка, при избирането на *in vivo* модел на оксидативен стрес при експериментални животни е избрана индометацин-индуцираната улцерогенеза. Интерес представлява фактът, че именно 1/100 ВИЛС е сравним с 1/500 ЕИДС по съдържание на полифеноли в грам растителна маса, въпреки различните дроги и екстрагенти. Предвид резултатите от извършения фитохимичен анализ с HPLC, се отхвърля възможността тази зависимост да бъде определена от състава на полифенолите в изследваните извлеци – във ВИЛС преобладават галовата киселина и галотанините, а в ЕИДС – фустина и сулфуретина.

В научната литература липсват данни за биологичната активност на 1/500 ЕИДС, което дава основание той също да бъде изследван в *in vivo* модели на оксидативен стрес и токсичност при опитни животни, като неговите ефекти се сравнят с тези на ВИЛС. При избора на най-подходяща проба, с която да бъдат третирани опитните животни, се наложи да бъде проследено изменението в ОПС и АОА на ЕИДС в зависимост от времето, подобно на традиционното

отлежаване на домашната ракия, оцветена с дървесина от смрадлика. Въз основа на получените резултати е избрано експерименталните животни да се третират с 1/1000 ЕИДС от необработена дървесина, престояла в 40% етанол поне 20 дни, когато спира линейното нарастване на ОПС и съответстващата му АОА. Наличието на изключително висока корелация между АОА и ОПС ( $r=0.98$ ) показва, че именно полифенолите са основните съединения, които допринасят за АОА на извлеките. Получените данни са в съответствие със сведението на Matic et al. (2013) за високо съдържание на полифеноли в метанолен екстракт от стъблото на смрадлика.

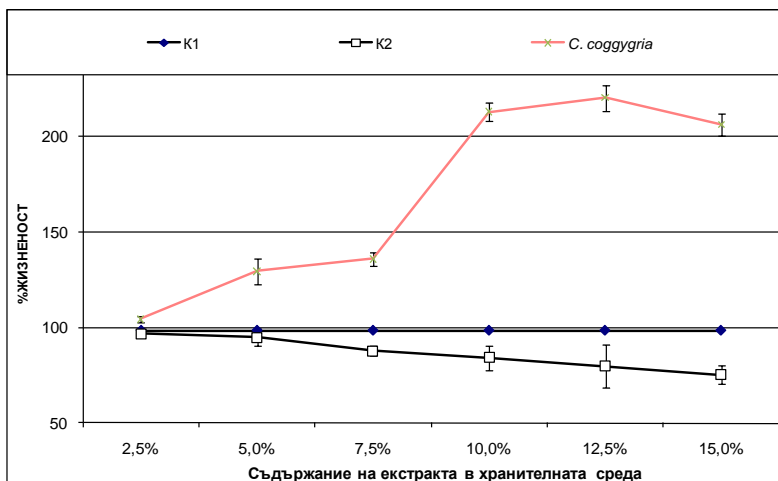
Няма съответствие в качествения състав на екстракта от екземпляр на смрадлика от Сърбия спрямо изследвания 1/500 ЕИДС – Matic et al. (2013) посочват мирицетин, докато HPLC-анализа доказва фустин и сулфуретин. Разликата се дължи на факта, че Matic et al. (2013) използват за доказването на мирицетин смес от няколко стандарта на полифеноли, в която смес отсъстват свидетелите фустин и сулфуретин, доказани чрез фитохимичен анализ от румънски учени (Antal et al., 2010). Предвид отсъствието на данни за високо съдържание на етерични масла в дървесината от смрадлика (смрадликовото масло се добива от листата), най-вероятно *in vitro* АОА на 1/500 ЕИДС се дължи на фустина и сулфуретина. Предвид фактът, че 1/100 ВИЛС е сравним с 1/500 ЕИДС по съдържание на полифеноли в грам растителна маса, е избрано тестовите за токсичност върху клетъчни култури да се извършат и за 1/500 ЕИДС, в който количеството на екстрахираната растителна маса е 5 пъти по-високо спрямо тази за 1/100 ВИЛС, съответстваща на рецепта от народната медицина срещу стомашни язви.

От изследваните шест фракции, с високи ОПС и АОА се отличава етилацетатната фракция от листа на смрадлика (ЕАФЛС), с която е избрана при оценката на противодиабетния потенциал на смрадликата.

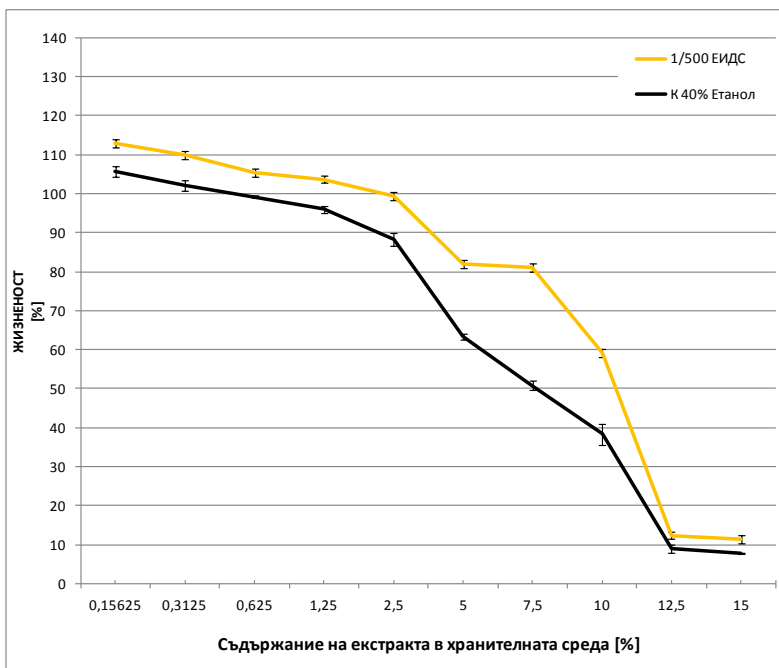
### Тестове за токсичност

#### 4. Провеждане на МТТ тест за цитотоксичност на извлекци от *C. cogggria* върху клетъчни култури: 3Т3-L1 (миши преадипоцити) и J774А.1 (миши макрофаги)

Резултатите от МТТ-теста за цитотоксичност на изследваните екстракти върху преадипоцити за 5/100 ЕИЛС и 1/500 ЕИДС са представени съответно на фиг. 6 и 7. При ЕИЛС е установено стимулиране на клетъчната пролиферация с увеличаване на процентното участие на извлекта в хранителната среда, докато при ЕИДС жизнеността на клетките намалява прогресивно, но не е по-ниска спрямо контролата, третирана с 40% етанол. От представените резултати се вижда, че процентното съдържание, в което двата екстракта не са цитотоксични за преадипоцити са съответно 2,5-15% за ЕИЛС и 0,15-2,5% за ЕИДС.

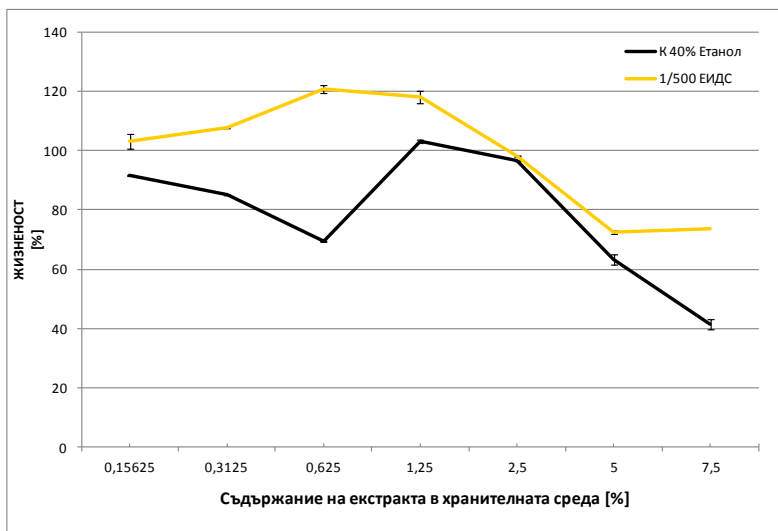


**Фигура 6.** Влияние на 40% водно-етанолен извлек от листа на смрадлика (ЕИЛС) върху жизнеността на 3Т3-L1 преадипоцити. Легенда: K1 – нетретираните клетки; K2 – контрола (40% етанол)



**Фигура 7.** Влияние на 40% водно-етанолен извлек от дървесина на смрадлика (ЕИДС) върху жизнеността на 3Т3-Л1 преадипоцити

Резултатите от МТТ-теста за цитотоксичност на изследваните екстракти върху макрофаги за 40% водно-етанолен извлек от дървесина на смрадлика (ЕИДС) са представени на фиг. 8. Получени са сходни данни за цитотоксичността на ЕИДС спрямо същия тест при преадипоцити – жизнеността на клетките намалява прогресивно с увеличаване на процентното участие на екстракта в хранителната среда, но не е по-ниска спрямо контролата, третирана с 40% етанол. Диапазонът на процентното съдържание, в което ЕИДС не е токсичен за макрофаги е 0,15-1,25% (фиг. 8).



**Фигура 8.** Влияние на 40% водно-етанолен извлек от дървесина на смрадлика (ЕИДС) върху жизнеността на J774A.1 макрофаги

**Обсъждане.** Наблюдаваният стимулиращ ефект на ЕИЛС върху клетъчната пролиферация (фиг. 6) е в противовес с обобщението на Hsu et al. (2006, 2007), които установяват, че галовата киселина (основното фенолно съединение в листата на смрадликата) предизвиква апоптоза при 3T3-L1 преадипоцити. Ето защо, клетъчната пролиферация при преадипоцити най-вероятно е стимулирана от фитохимичен компонент на ЕИЛС, който е различен от главните съставки на листата от смрадлика галова киселина и галотанини. Не е изключено, комбинацията от полифеноли в общия екстракт да има ефект, различен от този на чистите компоненти, тъй като често при изследванията на природни продукти от растителен произход се установява такава разлика. Пролиферативният ефект на 5/100 ЕИЛС би могъл да се обясни и със способността на някои фенолни съединения да активират MAP сигналните каскади (Kong et al., 2000).

Измерването на клетъчната жизненост след прилагане на 1/500 ЕИДС върху J744A.1 макрофаги също показва стимулиращ ефект при по-ниските процентни участия на извлека в хранителната среда – до 1,25% (фиг. 8). При нарастване съдържанието на ЕИДС в хранителната среда жизнеността започва плавно да намалява, но остава все още по-висока от тази на контролата, третирана с 40% етанол. Подобни са резултатите за същия извлек при преадипозити (фиг. 7). Може да се приеме, че при преадипозити и макрофаги ЕИДС проявява цитопротективен ефект. Резултатите от проведените МТТ-тестове върху преадипозити и макрофаги показват, че екстрактите от листа и дървесина на смрадлика не проявяват цитотоксичност. Последното е основание, извлечите да бъдат тествани за токсичност при експериментални животни.

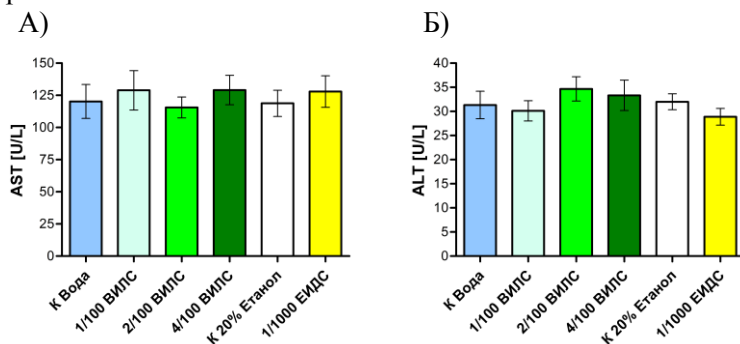
## **5. Третиране на мъжки *Wistar* плъхове в модел на субхронична токсичност (30 дни)**

### **5.1. Промени в биохимичните показатели**

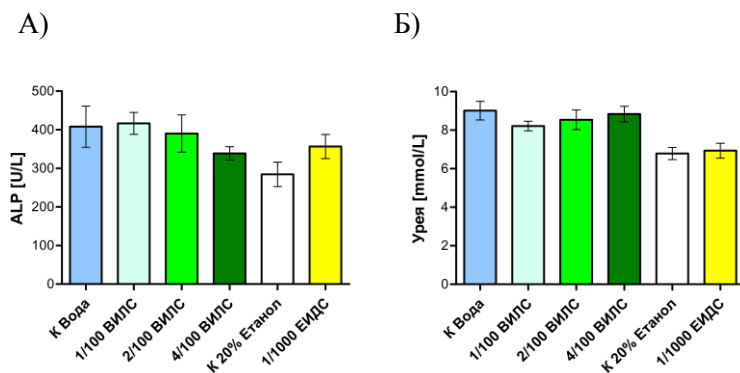
#### **5.1.1. Биохимични анализи на кръвен серум**

Резултатите от биохимичните анализи на кръвния серум свидетелстват за отсъствието на значими увреди на черния дроб и бъбреците на третираните с три ВИЛС и 1/1000 ЕИДС групи, в сравнение с контролните групи Вода и 20% Етанол. Не са установени статистически значими разлики в серумните активности на маркерите за чернодробно увреждане: аспартат аминотрансфераза (АсАТ) (фиг. 9А), аланин аминотрансфераза (АлАТ) (фиг. 9Б) и алкална фосфатаза (АФ) (фиг. 10А). Няма разлики и в концентрацията на показателите за бъбречно увреждане урея (фиг. 10Б) и креатинин (фиг. 11А). Тридесет дневното третиране на животните не води до промяна в оксидативния статус на кръвта, засвидетелствано от липсата на промени в концентрациите на мощния ендогенен неензимен антиоксидант пикочна киселина (фиг. 11Б) и общите тиоли (сулфхидрилни групи) (фиг. 12А). Установено е, обаче,

значително намаляване концентрацията на МДА за групата, третирана с 1/100 ВИЛС ( $P < 0.05$  спрямо водната контрола) (фиг. 12Б), което показва свойството на ВИЛС да намалява липидната пероксидация, като следствие от оксидативния стрес.

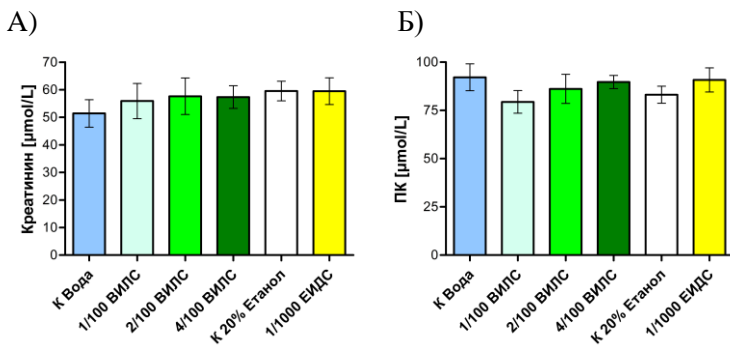


**Фигура 9.** Активност на АсАТ и АлАТ в кръвен серум от плъхове, третирани с извлекци от листа и дървесина на смрадлика в модел на субхронична токсичност: А) аспартат аминотрансфераза (AST); Б) аланин аминотрансфераза (ALT)

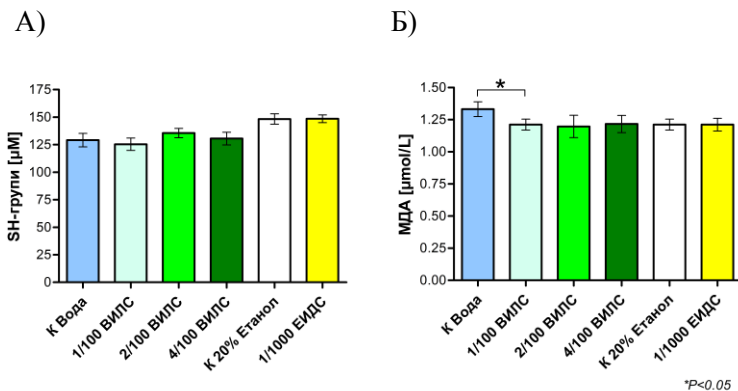


**Фигура 10.** Активност на АФ и концентрация на урея в кръвен серум от плъхове, третирани с извлекци от листа и дървесина на смрадлика в модел на субхронична токсичност: А) алкална фосфатаза (ALP); Б) урея





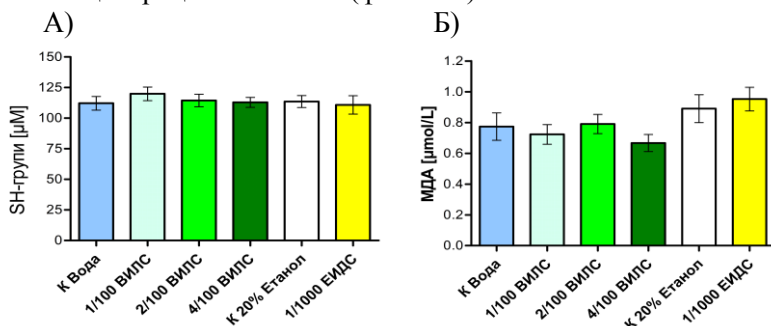
**Фигура 11.** Концентрация на креатинин и пикочна киселина в кръвен серум от плъхове, третиран с извлекци от листа и дървесина на смрадлика в модел на субхронична токсичност: А) креатинин; Б) пикочна киселина (ПК)



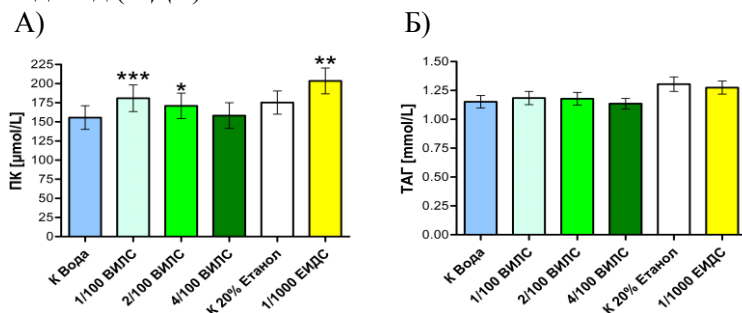
**Фигура 12.** Концентрация на общи тиоли и МДА в кръвен серум от плъхове, третиран с извлекци от листа и дървесина на смрадлика в модел на субхронична токсичност: А) общи тиоли (SH-групи); Б) малонов диалдехид (МДА)

### 5.1.2. Биохимични анализи на хомогенат от черен дроб

Установено е повишение в нивата на пикочната киселина за групите 1/100 и 2/100 ВИЛС спрямо водната контрола, както и при 1/1000 ЕИДС спрямо контролата 20% Етанол (фиг. 14А). Няма разлики в показателите за оксидативен стрес (фиг. 13А, Б), както и данни за чернодробна стеатоза, видно от концентрациите на ТАГ (фиг. 14Б).



**Фигура 13.** Концентрация на общи тиоли и МДА в чернодробен хомогенат от плъхове, третирани с извлекци от листа и дървесина на смрадлика в модел на субхронична токсичност: А) общи тиоли (SH-групи); Б) малонов диалдехид (МДА)

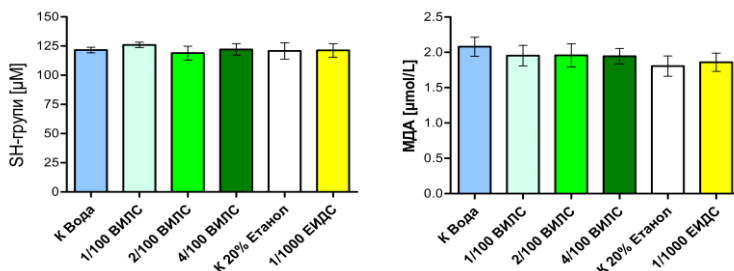


\*\*\*P<0.001 спрямо K Вода; \*\*P<0.01 спрямо K 20% Етанол;  
\*P<0.05 спрямо K Вода

**Фигура 14.** Концентрация на пикочна киселина и триглицериди в чернодробен хомогенат от плъхове, третирани с извлекци от листа и дървесина на смрадлика в модел на субхронична токсичност: А) пикочна киселина (ПК); Б) триглицериди (ТАГ)

### 5.1.3. Биохимични анализи на хомогенат от бъбрек

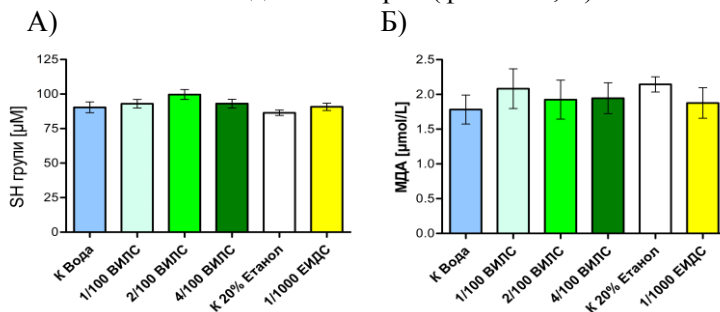
Няма статистически значими разлики в концентрациите на показателите за оксидативен стрес (фиг. 15А, Б).



**Фигура 15.** Концентрация на общи тиоли и МДА в хомогенат от бъбрек на плъхове, третирани с извлекци от листа и дървесина на смрадлика в модел на субхронична токсичност: А) общи тиоли (SH-групи); Б) малонов диалдехид (МДА)

### 5.1.4. Биохимични анализи на хомогенат от мозък

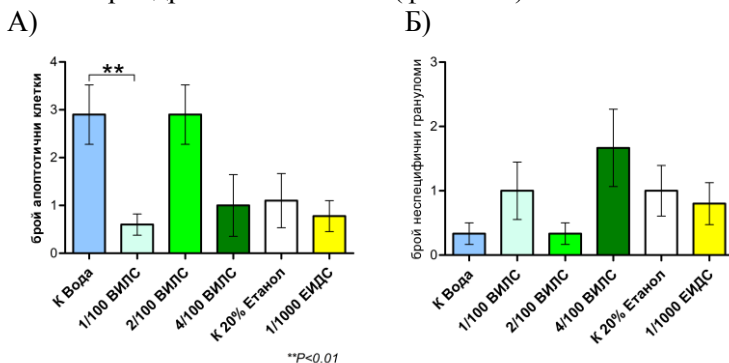
Няма статистически значими разлики в концентрациите на показателите за оксидативен стрес (фиг. 16А, Б).



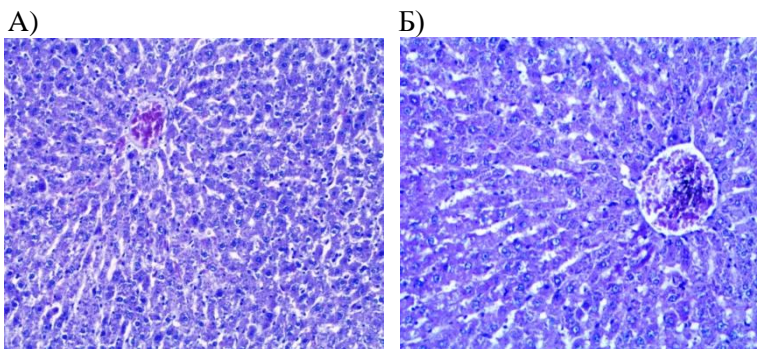
**Фигура 16.** Концентрация на общи тиоли и МДА в хомогенат от мозък на плъхове, третирани с извлекци от листа и дървесина на смрадлика в модел на субхронична токсичност: А) общи тиоли (SH-групи); Б) малонов диалдехид (МДА)

## 5.2. Хистопатологични промени в черния дроб и бъбреците

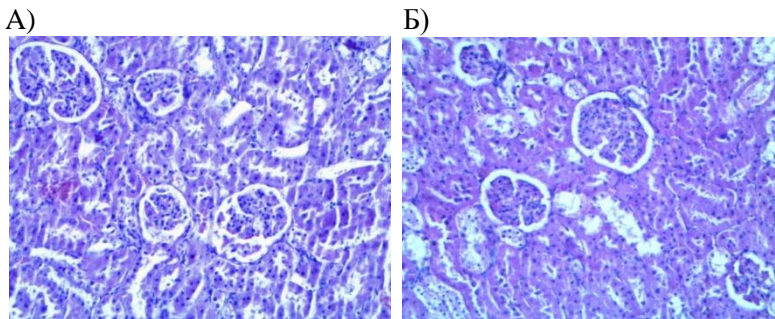
Черният дроб и бъбреците на плъховете от всички групи, третиран с ВИЛС и ЕИДС, са със запазена архитектура, без дегенеративни промени, огнища на възпаления и некрози (фиг. 18 и 19). За черния дроб липсват данни за дезорганизация на делчетата и микровезикуларна стеатоза. Установено е, че 1/100 ВИЛС намалява статистически значимо чернодробната апоптоза (фиг. 17А).



**Фигура 17.** Брой апоптотични клетки (А) и неспецифични грануломи (Б) в черен дроб на плъхове, третиран с извлекци от листа и дървесина на смрадлика в модел на субхронична токсичност



**Фигура 18.** Черен дроб на плъхове, третиран с извлекци от листа и дървесина на смрадлика в модел на субхронична токсичност: А) Контрола Вода; Б) 4/100 ВИЛС (X100)



**Фигура 19.** Бъбреци на плъхове, третирани с извлекци от листа и дървесина на смрадлика в модел на субхронична токсичност: А) Контрола Вода; Б) 4/100 ВИЛС (X100)

**Обсъждане.** Сведенията от българската народна медицина за токсичността на водния извлек от листа на смрадлика (Стоянов, 1972; Воденичаров, Петров, 2001; Ланджев, 2010), са проверени в модел на субхронична токсичност при плъхове. В тази връзка, може да се предположи, че високото съдържание на фенолни съединения във ВИЛС и ЕИДС с възможна липса на *in vivo* АОА и потенциален прооксидативен ефект, би могло да активира обезвреждането на някои от тях като ксенобиотици с участието на цитохром P<sub>450</sub> монооксигеназната система, при което да се получат токсични метаболити с прооксидантен ефект.

При биохимичните маркери за увреждане на чернодробния паренхим, обаче, не са установени статистически значими разлики в серумните нива на АсАТ, АлАТ и АФ при плъхове, третирани с ВИЛС и ЕИДС спрямо двете контроли (фиг. 9А, Б и 10А). Липсата на оксидативен стрес, като ефект от токсичността на екстрактите върху черен дроб, се доказва и от резултатите за концентрацията на общи тиоли и МДА в кръвен серум и чернодробен хомогенат (фиг. 12А, Б и 13А, Б) – също липсват статистически значими разлики. Нещо повече: 1/100 ВИЛС демонстрира потенциални антиоксидантни свойства, тъй като е установено значително намаление ( $p < 0.05$ ) в серумните концентрации на МДА спрямо контролната група, третирана с вода (фиг. 12Б).

Най-вероятно този ефект се дължи на съдържанието на полифеноли във ВИЛС.

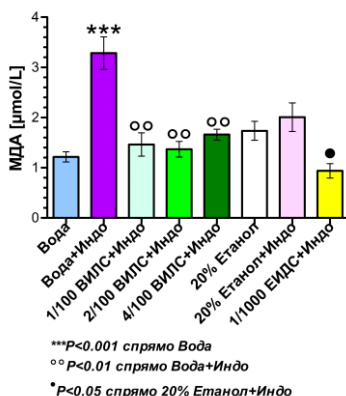
Сигнификантното повишение ( $p < 0.001$ ) в концентрацията на пикочна киселина в хомогенат от черен дроб е с дозозависим ефект. Установено е намаление нивата на пикочната киселина с увеличаване концентрацията на водния извлек от листа (фиг. 14А). Липсата на хиперурикемия (фиг. 11Б), показва, че повишението в нивата на ПК в чернодробен хомогенат не се дължи на масивно чернодробно увреждане с ускорен катаболизъм на пуринови нуклеотиди след увреждане на ДНК. Последното се потвърждава и от липсата на некротични и дегенеративни (хидропични, балонни) промени с дезорганизация на чернодробните делчета и микровезикуларна стеатоза при хистопатологичното изследване (фиг. 18). Преброяването на апоптотичните клетки в черен дроб показва статистически значимо намаление в броя им ( $p < 0.01$ ) при групата, третирана с 1/100 ВИЛС в сравнение с водната контрола (фиг. 17А). Липсват данни за чернодробна стеатоза и в резултатите за триглицериди в чернодробен хомогенат (фиг. 14Б), като същото е потвърдено от хистопатологичните анализи (фиг. 18). Нещо повече: третирането с 1/1000 ЕИДС води до намаляване на серумните ТАГ спрямо контролната група, третирана с 20% Етанол. Ето защо, високите чернодробни нива на пикочната киселина могат да бъдат свързани не с тъканно увреждане, а с индуцирането на експресията на много гени от различни сигнални пътища (Myhrstad et al., 2002; Nicholson et al., 2008), с което биха могли да допринесат до нарастването на РНК в хепатоцити, а активираният нуклеотиден метаболизъм и последващото го усилено разграждане на нуклеотиди да обуславя по-високите нива на пикочната киселина. Няма данни за оксидативен стрес, като ефект от токсичността на екстрактите върху бъбреци и мозък (фиг. 15 и 16). Не са отчетени нарушения в биохимичните показатели за бъбречни увреждания урея и креатинин (фиг. 10Б и 11А), което е потвърдено от хистопатологичните анализи на бъбреците (фиг. 19).

## Биологични ефекти на екстракти от смрадлика

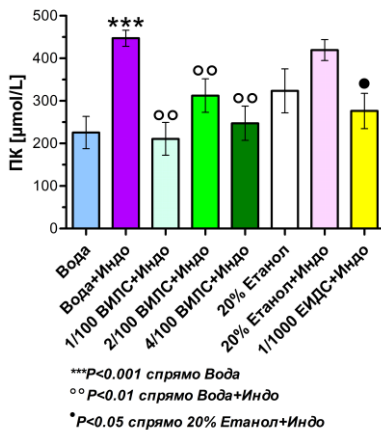
### 6. Модел на индометацин-индуцирана стомашна улцерогенеза

#### 6.1. Биохимични анализи на хомогенат от стомах

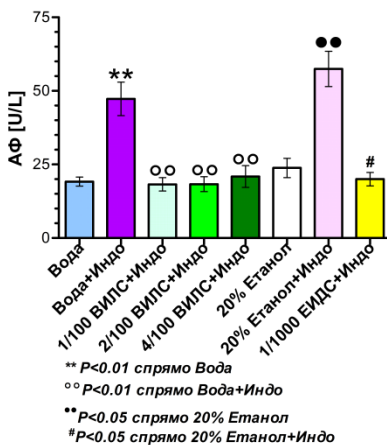
Моделът на индометацин-индуцирана стомашна улцерогенеза чрез генериране на масивен оксидативен стрес е верифициран чрез статистически значимото увеличение ( $P < 0.001$ ) в концентрацията на биохимичния маркер за липидна пероксидация МДА при групата Вода+Индометацин спрямо водната контрола (фиг. 20). Същата тенденция е регистрирана и при сравнението на резултатите за група 20% Етанол+Индо спрямо контролата 20% Етанол. Установено е статистически значимо понижение в концентрацията на МДА при всички групи, които са претретираны с извлекци от смрадлика, след приложението на индометацин (фиг. 20). Същите резултати са отчетени и при биохимичните маркери за некроза: пикочна киселина (фиг. 21) и алкална фосфатаза (фиг. 22). Получените биохимични резултати не показват дозозависим ефект от приложението на трите прилагани ВИЛС: и при трите изследвани показателя има статистически значимо намаление ( $P < 0.01$ ) спрямо контролната група Вода+Индо.



**Фигура 20.** Концентрация на малонов диалдехид (МДА) в хомогенат от стомах на плъхове, третираны с извлекци от листа и дървесина на смрадлика в модел на индометацин-индуцирана улцерогенеза



**Фигура 21.** Концентрация на пикочна киселина (ПК) в хомогенат от стомах на плъхове, третирани с извлекци от листа и дървесина на смрадлика в модел на индометацин-индуцирана улцерогенеза



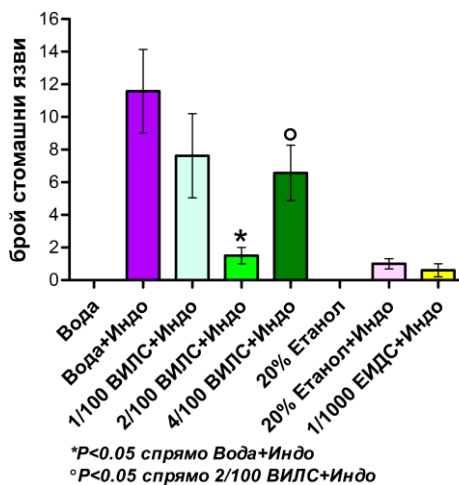
**Фигура 22.** Активност на алкалната фосфатаза (АФ) в хомогенат от стомах на плъхове, третирани с извлекци от листа и дървесина на смрадлика в модел на индометацин-индуцирана улцерогенеза



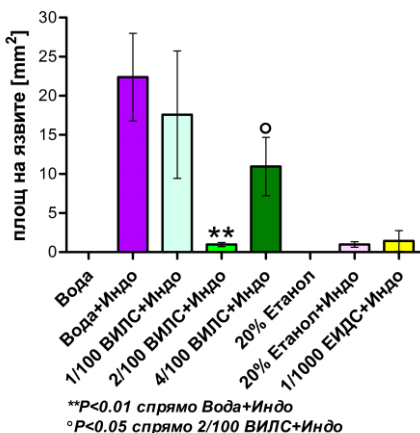
## 6.2. Морфометрични измервания на язви в стомашната лигавица

Макроскопският оглед на стомашната лигавица показва, че при контролната група Вода няма язвени дефекти. При всички животни от група Вода+Индометацин има различни по брой и големина мукозни лезии, изпълнени с тъмно червен до кафяво-черен хематинов материал. По-голямата част от дефектите са по повърхността на лигавичните гънки.

Средният брой стомашни язви за група Вода+Индометацин е 11.58 (фиг. 23) при средна площ  $22.39 \text{ mm}^2$  (фиг. 24). Броят и площта на язвените дефекти при животните, претретиран с 2/100 ВИЛС, са статистически значимо по-ниски спрямо група Вода+Индометацин. При контролата 20% Етанол няма язвени дефекти. Получените резултати свидетелстват за гастропротективен ефект единствено за 2/100 ВИЛС.



**Фигура 23.** Брой на стомашните язви при плъхове, третиран с извлекци от листа и дървесина на смрадлика в модел на индометацин-индуцирана улцерогенеза



**Фигура 24.** Площ на стомашните язви при плъхове, третиран с извлекци от листа и дървесина на смрадлика в модел на индометацин-индуцирана улцерогенеза

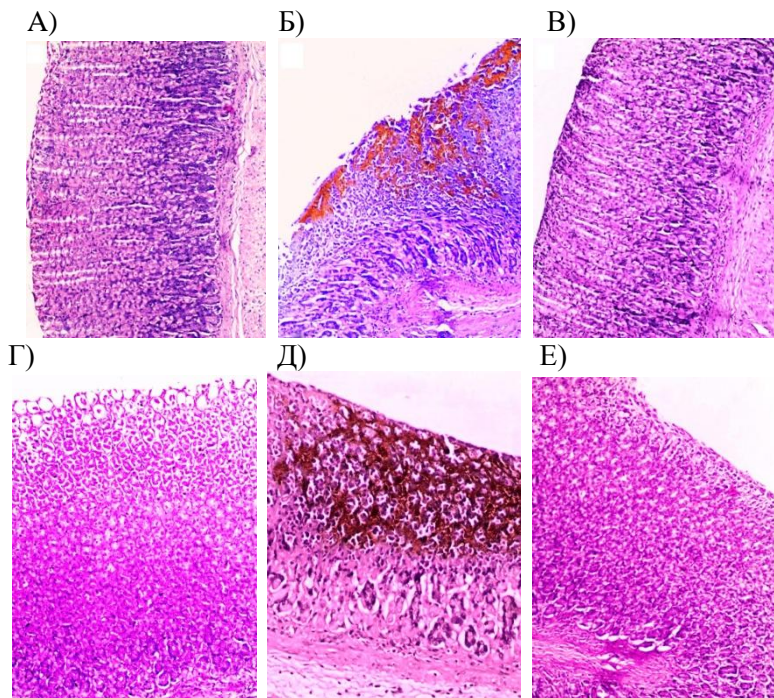
### 6.3. Хистопатологична оценка на промените в стомашната лигавица

Стомашната лигавица на плъховете от контролната група Вода е напълно нормална (фиг. 25А). Индометацинът, прилаган след претретиране с вода (група Вода+Индометацин), предизвиква ерозии на лигавицата, обхващащи до 2/3 от дебелината ѝ, масивни кръвоизливи, обширни некрози и множество огнища на възпаление (табл. 2, фиг. 25Б). При животните, претретиран с ВИЛС и ЕИДС ерозиите са по-повърхностни и по-малки по площ, отколкото при плъховете от група Вода+Индо. При група 2/100 ВИЛС+Индометацин (фиг. 25В) стомашната лигавица е напълно нормална. Претретирането с 1/1000 ЕИДС намалява площта на индометацин-индуцираната некроза и огнищата на възпаление спрямо контролата 20% Етанол (табл. 2). Получените резултати от патологоанатомичната оценка категорично потвърждават морфометричните сведения за гастропротективен ефект на 2/100 ВИЛС и свидетелстват за същия ефект при групата, претретирана с 1/1000 ЕИДС.

**Таблица 2.** Оценка степента на увреда на стомах от плъхове, третиран с воден извлек от листа от смрадлика (ВИЛС) и етанолен извлек от дървесина на смрадлика (ЕИДС) в модел на индуцирана с индометацин (Индо) улцерогенеза. Легенда: +++ висока; ++ умерена; + ниска; – няма

| Група               | Дълбоки ерозии | Масивни кръвоизливи | Некрози на епитела | Възпаления |
|---------------------|----------------|---------------------|--------------------|------------|
| Контрола Вода       | –              | –                   | –                  | –          |
| Вода+Индометацин    | +++            | +++                 | +++                | +++        |
| 1/100 ВИЛС + Индо   | ++             | ++                  | ++                 | –          |
| 2/100 ВИЛС + Индо   | –              | –                   | –                  | –          |
| 4/100 ВИЛС + Индо   | +              | +                   | +                  | –          |
| Контрола 20% Етанол | –              | –                   | ++                 | ++         |
| 20% Етанол + Индо   | +++            | +++                 | +++                | +++        |
| 1/1000 ЕИДС + Индо  | –              | –                   | +                  | +          |

**Обсъждане.** Острата индометацин-индуцирана улцерогенеза е утвърден експериментален модел за изследване на гастропротективни агенти от растителен произход, в който критична роля за патогенезата на стомашните лезии от индометацин има оксидативният стрес (Pihan et al., 1987). Предвид получените данни за висока *in vitro* АОА на извлеките от смрадлика, от една страна в модела следва да се очаква гастропротективен ефект, а от друга – не е изключено синергичното действие на индометацин и богатите на полифеноли извлекци да усилят улцерогенезата, дължаща се на повишената липидна пероксидация от атаката на АКФ. Установено е, че индометацин индуцира множество увреждания. Претретирането с 2/100 ВИЛС понижава значително броя и площта на язвите, съответно с 87% (фиг. 23), и 96% (фиг. 24), което свидетелства за гастропротективен ефект на 2/100 ВИЛС. Такъв ефект не е установен за останалите извлекци.



**Фигура 25.** Стомах от плъх от контролната група (А), Индо (Б), 2/100 ВИЛС+Индо (В), контролната група 20% етанол (Г), 20% етанол + Индо (Д) и 1/1000 ЕИДС + Индо (Е) (X100)

Резултатите от хистопатологичните изследвания показват, че стомашната лигавица на животните от група 2/100 ВИЛС + Индо е с нормална архитектура, без дълбоки ерозии (табл. 2, фиг. 25В), идентична с тази на контролната група (табл. 2, фиг. 25А). За група Вода+Индо са характерни множество дълбоки ерозии, обхващащи до 2/3 от дебелината на стомашната мукоза, масивни кръвоизливи, некрози на епитела и възпалителни промени (табл. 2, фиг. 25Б). За останалите две групи, които са претретираны съответно с 1/100 и 4/100 ВИЛС, не е установен гастропротективен ефект на извлеките. Частичният гастропротективен ефект на 1/1000

ЕИДС се изразява в намаление на възпалението, липса на обширни некрози и масивни кръвоизливи (табл. 2, фиг. 25Е).

Резултатите от измерваните биохимични маркери показват, че стомашните нива на МДА за група Вода+Индо, са повишени с 270% спрямо контролната група Вода, с което се верифицира модела, тъй като най-вероятния патобиохимичен механизъм на улцерогенеза е именно оксидативният стрес. Отчетено е статистически значимо понижение ( $P < 0.01$ ) в концентрацията на МДА в стомашен хомогенат и за трите групи, претретиран с ВИЛС в сравнение с група Индо. Същата тенденция е регистрирана и за стомашните нива на пикочната киселина и алкалната фосфатаза, като маркери за стомашно увреждане (Varley et al, 1991), включително и за ЕИДС. Не са установени статистически значими разлики в серумните нива на МДА, ПК и SH-групи, най-вероятно поради краткия период от 4 часа между третирането с индометацин и пробовземането на кръв.

Представените резултати за *in vivo* антиоксидантните свойства на извлекци от листа и дървесина на смрадлика са първи по рода си и убедително потвърждават оскъдните сведения за вътрешното приложение на смрадликата като лечебно растение. Претретирането с 2/100 ВИЛС и 1/1000 ЕИДС облекчава стомашните лезии и намалява индометацин-индуцираното увеличение на АФ и ПК. Може да се предположи, че гастропротективният ефект на 2/100 ВИЛС и 1/1000 ЕИДС се дължи изцяло на техните антиоксидантни свойства, видно от понижените стомашни нива на МДА и потвърдено от извършените морфометрични измервания и хистопатологични анализи.

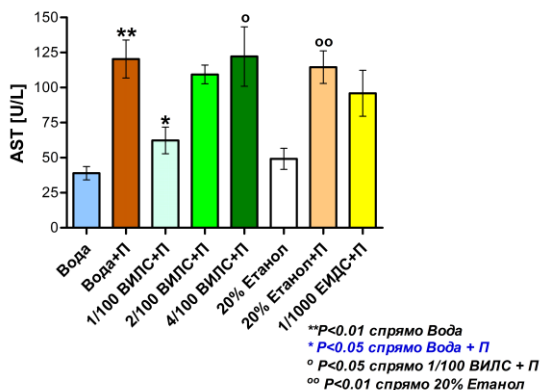
## **7. Модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност**

### **7.1. Биохимични анализи на кръвен серум**

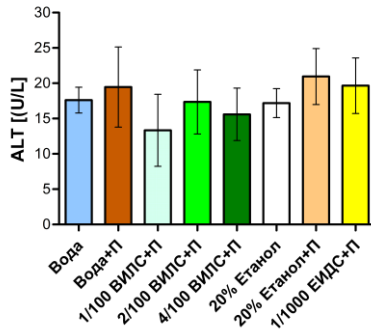
Моделът на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност чрез генериране на масивен оксидативен стрес е верифициран чрез значително намаление ( $P < 0.01$ ) в концентрацията на

биохимичния маркер за антиоксидантна защита на кръвта – пикочна киселина при групата Вода+Парацетамол (П) спрямо водната контрола (фиг. 28), както и чрез регистрираното статистически значимо повишение ( $P<0.05$ ) в активностите на биохимичния маркер за чернодробно увреждане – ензима аспартат аминотрансфераза при тази група (фиг. 26). Същата тенденция е отчетена и при група 20% Етанол+П спрямо контролата 20% Етанол (фиг. 26 и 28).

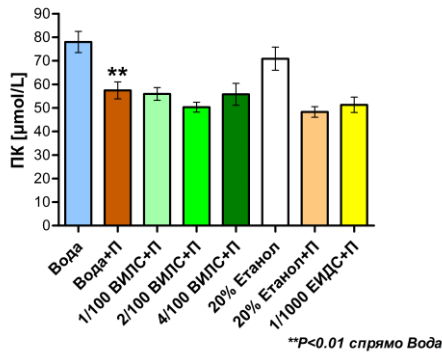
За група 1/100 ВИЛС+П е установено намаление ( $P<0.05$ ) в нивата на последния ензим спрямо контролата Вода+П, като е налице и дозозависимо увеличение при група 4/100 ВИЛС+П (фиг. 26). Няма статистически значими разлики в нивата на останалите измервани биохимични показатели: АлАТ (фиг. 27), алкална фосфатаза, общи тиоли, МДА и триглицериди. Въпреки това са налице тенденции за намаление нивата на АлАТ при група 1/100 ВИЛС+П (фиг. 27), увеличение нивата на АФ при група Вода+П, както и увеличение нивото на МДА, като маркер за липидна пероксидация – пряко следствие от оксидативен стрес след прилагането на парацетамол при сравнението на двете двойки контроли.



**Фигура 26.** Активност на АсАТ в кръвен серум от плъхове, третирани с извлекци от листа и дървесина на смрадлика в модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност



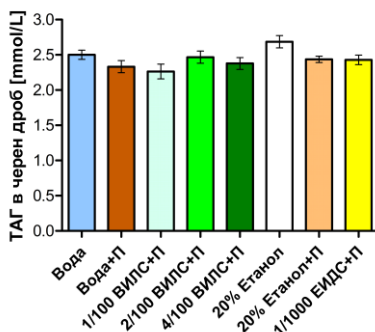
**Фигура 27.** Активност на АлАТ в кръвен серум от плъхове, третирани с извлекци от листа и дървесина на смрадлика в модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност



**Фигура 28.** Концентрация на пикочна киселина (ПК) в кръвен серум от плъхове, третирани с извлекци от листа и дървесина на смрадлика в модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност

## 7.2. Биохимични анализи на хомогенат от черен дроб

Резултатите от измервания биохимичен маркер за чернодробна стеатоза (фиг. 29) не показват статистически значими разлики между отделните групи животни.



**Фигура 29.** Концентрация на ТАГ в хомогенат от черен дроб от плъхове, третирани с извлекци от листа и дървесина на смрадлика в модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност

## 7.3. Хистопатологична оценка на промените в черния дроб

Парацетамолът предизвиква тежки некротични и дегенеративни промени с дезорганизация на централните и частично на интермедиерните зони на чернодробните делчета (фиг. 30Б). Наблюдават се хепатоцити с балонна дегенерация и по-рядко с ацидофилна некроза в непосредствена близост с централните вени и интермедиерните зони. Резултатите потвърждават биохимичните резултати за хепатопротективен ефект на 1/100 ВИЛС (фиг. 26). Черните дробове на животните от тази група са със запазена архитектура, без обширни некрози, огнища на възпаление и балонна дегенерация (табл. 3, фиг. 30В). При останалите две групи, претретирани с ВИЛС, се наблюдават по-малки по площ зони с балонна дегенерация и некроза. Няма данни за стеатозни промени на чернодробния паренхим при всички групи

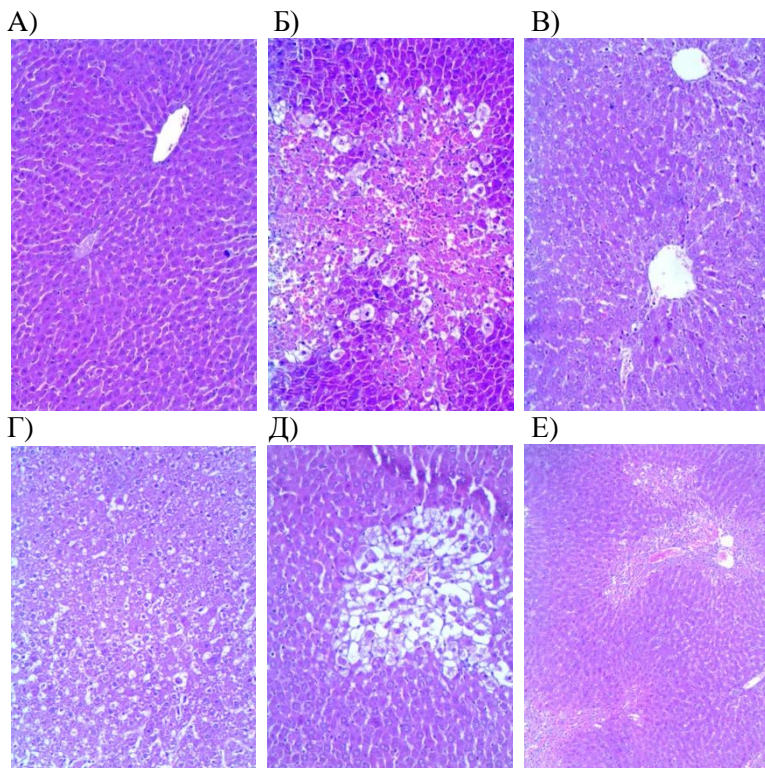


животни (фиг. 30), също потвърдено от биохимичните резултати за концентрацията на триглицериди в чернодробни хомогенати (фиг. 29).

**Таблица 3.** Оценка степента на увреда на черния дроб от плъхове, третирани с воден извлек от листа от смрадлика (ВИЛС) и етанолен извлек от дървесина на смрадлика (ЕИДС) в модел на индуцирана с парацетамол (П) хепатотоксичност. Легенда: +++ висока; ++ умерена; + ниска; – няма

| Група          | Обширни некрози | Балонна дегенерация | Неспецифични възпалителни грануломи | Апoptотични клетки |
|----------------|-----------------|---------------------|-------------------------------------|--------------------|
| Контрола Вода  | –               | –                   | –                                   | –                  |
| Вода+П         | +++             | +++                 | +++                                 | +++                |
| 1/100 ВИЛС+ П  | –               | –                   | –                                   | +                  |
| 2/100 ВИЛС+ П  | +               | +                   | ++                                  | ++                 |
| 4/100 ВИЛС + П | ++              | ++                  | ++                                  | ++                 |
| К 20% Етанол   | ++              | ++                  | ++                                  | ++                 |
| 20% Етанол + П | +++             | +++                 | +++                                 | +++                |
| 1/1000 ЕИДС+ П | +++             | +++                 | +++                                 | +++                |

**Обсъждане.** Парацетамол-индуцираната хепатотоксичност е утвърден експериментален модел за изследване на хепатопротективни агенти от растителен произход. Критична роля за патогенезата на чернодробното увреждане от парацетамол има оксидативният стрес. При метаболизирането на парацетамола се генерират свободни радикали, които предизвикват липидна пероксидация, нарушават мембрания пермеабилитет на митохондриите и водят до клетъчна некроза (Jaeschke et al., 2013).



**Фигура 30.** Черен дроб от плъх от контролната група вода (А), Парацетамол (Б), 1/100 ВИЛС+П (В), контролната група 20% етанол (Г), 20% етанол + П (Д) и 1/1000 ЕИДС + П (Е)(X100)

Извършеното проучване на *in vivo* антиоксидантните свойства на ВИЛС и ЕИДС в модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност при плъхове е първо по рода си. Установените промени в биохимичните показатели за чернодробно увреждане свидетелстват за протективен ефект на 1/100 ВИЛС, тъй като има статистически значима разлика ( $p < 0.05$ ) в плазмените нива на АсАТ спрямо контролата Вода +Парацетамол (П) – около 50% по-ниски (фиг. 26). Настоящото изследване демонстрира способността на 1/100

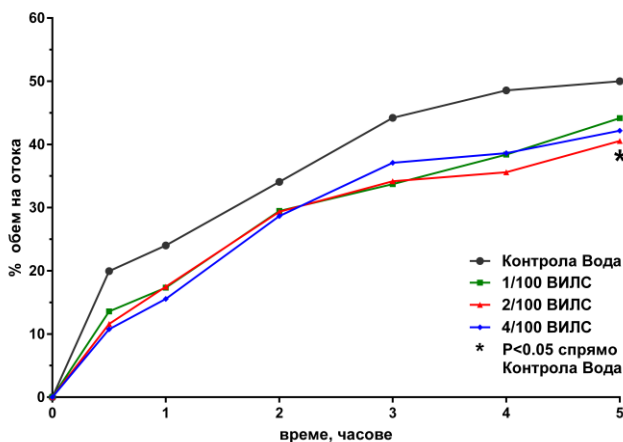
ВИЛС да инхибира парацетамол-зависимото повишение в кръвносерумната активност на АсАТ, който се счита за индекс на увреждане на чернодробните паренхимни клетки. Такъв ефект, обаче, не е установен за другите извлекци от листа и дървесина, но е важно да се отбележи, че 2/100 и 4/100 ВИЛС не усилват хепатотоксичността на парацетамола. Серумните нива на АсАТ след прилагането на 1/1000 ЕИДС с парацетамол, са по-ниски от контролата с 20% Етанол+П, следователно ЕИДС също не усилва токсичността за черен дроб, но и не е установен хепатопротективен ефект, предвид липсата на статистически значима разлика.

При измерването на биохимичните показатели за оксидативен стрес в кръвен серум не са установени разлики, което показва, че трите водни извлекци от листа и водно-етанолния извлек от дървесина нямат силно изявена *in vivo* серумна антиоксидантна активност в модела на остра парацетамол-индуцирана хепатотоксичност. При група Вода+П е регистрирана тенденция за повишаване на концентрациите на МДА (продукт от липидната пероксидация), и съответно свързаното с това намаление в концентрацията на SH-групите и пикочната киселина в сравнение с водната контрола.

С настоящото изследване се доказва, че 1/100 воден извлек от листа на смрадлика (ВИЛС) проявява хепатопротективен ефект. Такъв ефект не е установен за групите, претретиран с 2/100, 4/100 ВИЛС и 1/1000 ЕИДС, като не е регистрирано синергично усилване на хепатотоксичността на парацетамола. Тези резултати са първото научно доказателство за хепатопротективния ефект на ВИЛС с потенциал за бъдещи приложения при чернодробни заболявания или лекарствено индуцирана хепатотоксичност. Най-вероятният патобиохимичен механизъм на този ефект е намалението на липидната пероксидация, благодарение на антиоксидантните свойства на главните фитохимични компоненти галова киселина и галотанини, за които е добре известно, че упражняват такъв ефект (Rasool et al., 2010).

## 8. Модел на карагенан-индуцирано възпаление на задна лапа на плъх

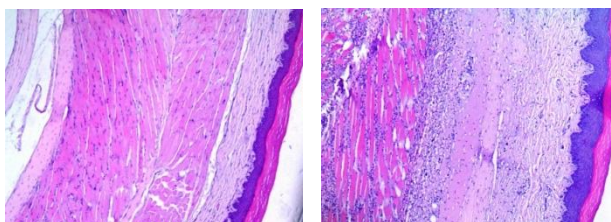
ВИЛС и ЕИДС предизвикват потискане на отока на лапата, което е най-изразено на петия час за група 2/100 ВИЛС (фиг. 31). Хистопатологичното верифициране на модела показва, че карагенанът причинява изразени циркулаторни нарушения, изобилие от неутрофили в дермата и скелетната мускулатура, които са с изразени некротични промени, до степен на формиране на флегмон (фиг. 32)



**Фигура 31.** Обем на карагенан-индуцирания възпалителен оток на задната лапа на плъх след претретиране с водни извлекци от листа на смрадлика (ВИЛС)

А)

Б)



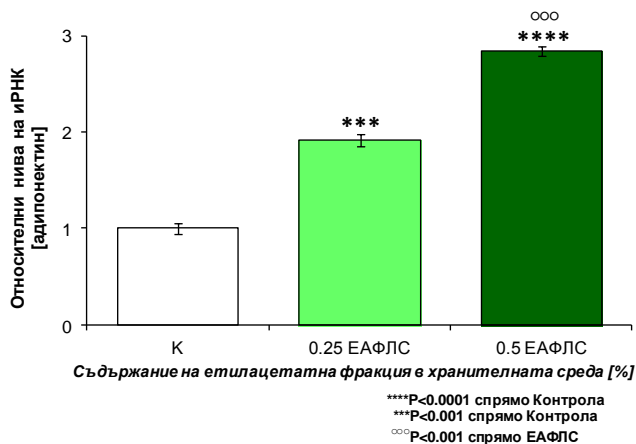
**Фигура 32.** Хистопатологична верификация на модела на карагенан-индуциран възпалителен оток на задната лапа на плъх: А) Негативна контрола; Б) Контрола вода

**Обсъждане.** Един от механизмите на противовъзпалително действие на флавоноидите е тяхната способност да инхибират неутрофилната дегранулация. Има доказателства, че в патогенезата на съдовите нарушения участват както медиаторите на възпалението, така и компонентите на оксидативния стрес. Полифенолите имат способността да се локализируют в ендотелните клетки и като следствие от това да намаляват ранимостта на ендотелните клетки от оксидативния стрес както на мембранно, така и на цитозолно ниво. Освен това, полифенолите могат да намаляват индуцираното от TNF- $\alpha$  повишение на различни медиатори на възпалението (IL-8, MCP-1, ICAM-1), които участват в придвижването на левкоцити към местата на увреждане или по протежение на ендотела.

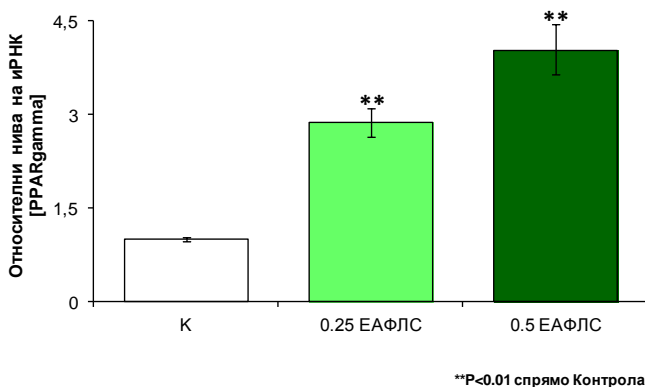
С високото съдържание на полифеноли във ВИЛС и ЕИДС могат да се потвърдят множеството етнофармакологични данни за противовъзпалителното действие на екстракти от листата на смрадлика. Хистопатологичното верифициране на модела показва, че карагенанът причинява тежък оток с остро възпаление на дермата и скелетната мускулатура, множество струпувания на неутрофилни левкоцити и образуване на флегмон (фиг. 32). Изчисленията за инхибицията на карагенан-индуцирания възпалителен оток на задната лапа на плъх от ВИЛС и ЕИДС показват, че екстрактите от смрадлика упражняват противовъзпалителен ефект. Средният обем на отока при група 2/100 ВИЛС е статистически значимо по-нисък ( $P < 0.05$ ) спрямо контролната група, 5 часа след инжектирането на карагенан (фиг. 31). Най-високите стойности за инхибиция на отока от 4/100 ВИЛС са регистрирани половин час след инжектирането на карагенан, а съответно, най-ниските са за 5-ия час. Сходна инхибиция, но без статистически значими разлики в обема на отока, са наблюдавани след претретиране с ЕИДС. Най-вероятният механизъм на този ефект включва намаление нивата на оксидативния стрес, което следва да се верифицира с ново изследване, включващо количествен анализ на избрани медиатори на възпалението.

## 9. Анализ на експресията на гени за адипонектин и PPAR $\gamma$

Установен е стимулиращ ефект на етилацетатната фракция от листа на смрадлика върху експресията на гена за адипонектин с дозозависим ефект (фиг. 33) и върху експресията на гена за PPAR $\gamma$  без дозозависим ефект (фиг. 34).



**Фигура 33.** Експресия на гена за адипонектин в 3Т3-Л1 клетки, третирани с избрани концентрации на етилацетатна фракция от листа на смрадлика (ЕАФЛС)



**Фигура 34.** Експресия на гена за PPAR $\gamma$  в 3Т3-Л1 клетки, третирани с избрани концентрации на етилацетатна фракция от листа на смрадлика (ЕАФЛС)

**Обсъждане.** Ролята на хормона адипонектин в поддържането на инсулиновата чувствителност е добре известна. Този противовъзпалителен адипокин с имуномодулиращо действие потиска експресията на TNF $\alpha$  – фактор свързан с патогенезата на инсулиновата резистентност. PPAR $\gamma$  рецепторът, активиран от тиазолидиндионовите препарати, има поне два пътя на действие, единият от които е т. нар. адипонектин-зависим път, чрез който се стимулира секрецията на адипонектин, а оттам се подобряват инсулиновата чувствителност и глюкозният метаболизъм (Iwaki et al., 2003; Kadowaki et al., 2006). Намалването на серумните нива на адипонектин при затлъстяване се счита за независим рисков фактор за диабет тип 2 и сърдечно-съдови заболявания, което предполага, че фармакологична намеса, насочена към повишаване производство на адипонектин, би могла да бъде обещаващ подход за лечение и/или профилактика на тези заболявания. При извършеното изследване е установен стимулиращ ефект на етилацетатната фракция от листа на смрадлика върху експресията на гена за адипонектин при преадипозити с дозозависим ефект (фиг. 33).

PPAR $\gamma$  принадлежат към суперсемейството на ядрените рецептори и участват регулацията на липидния и глюкозен метаболизъм и диференциацията на адипоцитите. Съществуват доказателства, че PPAR $\gamma$  регулират транскрипционно нивата на лептин, резистин и адипонектин (Chui et al., 2005; Steppan et al., 2001; Maeda et al., 2001). Техни лиганди могат да бъдат както ендогенни, така и екзогенни вещества, включително и синтетични лекарствени препарати. Към последната група принадлежат тиазолидиндионите използвани в контрола на диабет тип 2, като средства, подобряващи инсулиновата чувствителност и участващи в гликемичния контрол. При извършеното изследване е установен стимулиращ ефект на етилацетатната фракция от листа на смрадлика върху експресията на гена за PPAR $\gamma$  при преадипозити без дозозависим ефект (фиг. 34).

Ефектите на ЕАФЛС върху нивата на иРНК за PPAR $\gamma$  и адипонектин могат да бъдат отчасти обяснени с високото съдържание на галова киселина, за която има документирани множество активности като антиоксидантна, антиканцерогенна, противовъзпалителна, кардиопротективна, антиатерогенна, подобряване на ендотелната дисфункция, инхибиция на ангиогенезата и клетъчна антипролиферативна активност (Kim et al., 2006; Priscilla & Prince, 2009; Pal et al., 2010; Prasad et al., 2010; Rasool et al., 2010; Punithavath et al., 2011; Reckziegel et al., 2011). Не е изключено, обаче, комбинацията от полифеноли да упражнява ефект, различен от този за галовата киселина.

Получените за първи път в световната изследователска практика резултати от анализа на генната експресия дават основание да се счита, че екстракти от листата на смрадлика имат висок потенциал като терапевтици и суплементи в контрола на диабет тип 2, тъй като могат да повлияват механизми, свързани с изява на инсулинова резистентност най-малко по два начина – директен ефект върху експресията на PPAR $\gamma$  и адипонектин и индиректно, инхибирайки факторите, поддържащи нискостепенното възпаление, съпътстващо метаболитните нарушения при диабет тип 2, предвид данните за противовъзпалителните им свойства. С това се потвърждава единственото намерено етнофармакологично сведение за противодиабетните свойства на листата от смрадлика, налично в турската народна медицина от района на Лозенград (Kültür, 2007).



## VI. ИЗВОДИ

1. Главните фитохимични компоненти на листата от смрадлика (*Cotinus coggygia*) са свободната галова киселина и галотанините, а на дървесината – фустин и сулфуретин.
2. Извлеките от листа и дървесина на *C. coggygia* имат високо съдържание на фенолни съединения, на които се дължи и високата им залавяща и обезвреждаща *in vitro* антиоксидантна активност по отношение на азинобис-етилбензотиазолин-сулфонови радикали.
3. Общото полифенолно съдържание и *in vitro* антиоксидантната активност на 40% водно-етанолен извлек от дървесина на *C. coggygia* (ЕИДС) са в изключително силна зависимост предвид установената висока положителна корелация.
4. При *in vitro* МТТ-тестове за цитотоксичност, 40% водно-етанолен извлек от листа на *C. coggygia* повишава жизнеността на преадипоцити и стимулира клетъчната пролиферация. 1/1000 ЕИДС упражнява цитопротективен ефект при преадипоцити и макрофаги.
5. 1/100, 2/100 и 4/100 водни извлекци от листа на смрадлика (ВИЛС) и 1/1000 ЕИДС не са токсични за черен дроб, бъбреци и мозък в модел на субхронична токсичност при плъхове.
6. 1/100 ВИЛС проявява *in vivo* антиоксидантни свойства, като понижава концентрацията на МДА в кръвен серум и намалява апоптозата в черен дроб на плъхове в модел на субхронична токсичност.
7. 2/100 ВИЛС и 1/1000 ЕИДС упражняват гастропротективен ефект в остър модел на индометацин-индуцирана улцерогенеза при плъхове, изявен в намаление на липидната пероксидация и тъканното увреждане.
8. 1/100 ВИЛС проявява хепатопротективен ефект в модел на индуцирана с парацетамол остра чернодробна токсичност, изявен в намаление на тъканното увреждане. Такъв ефект не е установен за ЕИДС, като не е регистрирано

- синергично усилване на хепатотоксичността на парацетамола.
9. ВИЛС и ЕИДС проявяват противовъзпалителен ефект в остър модел на карагенан-индуциран оток на задна лапа на плъх, изявен в инхибиция на отока след 15-дневно претретиране с извлек.
  10. Етилацетатната фракция от листата на смрадлика има стимулиращ ефект върху експресията на гените за PPAR $\gamma$  и адипонектин при преадипоцити.
  11. Най-вероятният патобиохимичен механизъм на изброените биологични ефекти е намалението на липидната пероксидация, благодарение на антиоксидантните свойства на главните фитохимични компоненти на ВИЛС (галова киселина и галотанини), и ЕИДС (фустин и сулфуретин), което следва да се верифицира с нови сравнителни изследвания по същите модели, но с доказаните единични съставки.

## VII. ПРИНОСИ

1. Потвърдено е съдържанието на свободна галова киселина във воден извлек от листа на смрадлика (ВИЛС).
2. За първи път в световната изследователска практика е извършен фитохимичен анализ с апаратура за високоефективна течна хроматография (HPLC) на 40% водно-етанолен извлек от дървесина на смрадлика (ЕИДС).
3. За първи път е извършено фракциониране и пречистване на ЕИДС с изолиране на главните му съставки фустин и сулфуретин чрез високоефективна противоточна хроматография (НРССС).
4. За първи път е изследвана *in vitro* антиоксидантната активност и е измерено общото полифенолно съдържание на ЕИДС.
5. Потвърдени са наличните литературни данни за високата *in vitro* антиоксидантна активност на водния извлек от листа на *C. coggygia*.
6. Потвърдени са наличните литературни данни за взаимната връзка между общото полифенолно съдържание (ОПС) и антиоксидантна активност (АОА).
7. За първи път е извършено експериментално проучване с опитни животни върху ефектите на ВИЛС и ЕИДС в модели на:
  - 7.1. субхронична токсичност;
  - 7.2. парацетамол-индуцирана чернодробна токсичност;
  - 7.3. индометацин-индуцирана улцерогенеза;
  - 7.4. карагенан-индуциран възпалителен оток на задната лапа.
8. Получените експериментални данни разширяват познанията за ефектите на екстрактите от смрадлика, които биха дали научна обосновка на тяхното традиционно използване в народната медицина и биха допринесли за разширяване на показанията за тяхното използване. Тези данни биха послужили като предпоставка за планиране на клинични изпитвания при хора.

## VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Павлов, Д.,** Ефтимов, М., Цанева, М., Нашар, М., Иванова, Д., Вълчева-Кузманова, С. 2014. Гастропротективен ефект на воден извлек от листа на смрадлика (*Cotinus coggygia*) в модел на индометацин-индуцирана улцерогенеза при плъхове. – В: Сарафян, В., Маринов, Б. (отг. ред.) *Наука и младост: Сборник научни съобщения от конкурсна сесия 2014*, с. 37-41, МУ-Пловдив. ISSN 1314-9229.
2. **Павлов, Д.,** Цанева, М., Вълчева-Кузманова, С., Нашар, М., Калчев, К., Ефтимов, М., Иванова, Д. 2013. Биохимично и хистопатологично проучване на протективния ефект на воден извлек от листа на смрадлика (*Cotinus coggygia*) в модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност при плъхове. – В: Сарафян, В., Маринов, Б. (отг. ред.) *Наука и младост: Сборник научни съобщения от конкурсна сесия 2013*, с. 134-138, МУ-Пловдив. ISSN 1314-9229.
3. **Pavlov, D.,** Nashar, M., Eftimov, M., Kalchev, K., Valcheva-Kuzmanova, S., Tzaneva, M., Ivanova, D. 2013. Subchronic toxicity study of aqueous infusion from *Cotinus coggygia* leaves in Wistar rats. *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare Des Sciences*, 66 (5), 749-756. **IF: 0.198.**
4. **Павлов, Д.,** Нашар, М., Иванов, Д., Иванова, Д. 2012. *In vitro* антиоксидантни свойства на извлекци от смрадлика (*Cotinus coggygia*). *Известия на Съюза на учените – Варна, Серия „Медицина и екология“*, 1`2012/Том XVII, 72-76.

## IX. СПИСЪК НА УЧАСТИЯТА В НАУЧНИ ФОРУМИ С РЕЗУЛТАТИ ОТ ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### *Участия в международни научни форуми*

1. Vankova, D., Tasinov, O., Nazifova, N., **Pavlov, D.**, Kiselova, Y., Ivanova, D. Bulgarian medicinal plant extracts modulate PPARgamma and adiponectin gene expression levels in 3T3-L1 cells. NuGO Week, 28-31 August 2012, Helsinki, Finland.
2. **Pavlov, D.**, Nashar, M., Eftimov, M., Kalchev, K., Valcheva-Kuzmanova, S., Tzaneva, M., Ivanova, D. 2012. Subchronic toxicity study of aqueous infusion from *Cotinus coggygria* leaves in Wistar rats. XXXII Balkan Medical Week, 21-23 September 2012, Nis, Serbia.
3. Pasheva, M., Nashar, M., **Pavlov, D.**, Slavova, S., Ivanov, D., Ivanova, D. 2013. Antioxidant capacity of different woods traditionally used for coloring hard alcoholic beverages in Bulgaria. XXIII International Scientific Conference, 6-7 June 2013, Stara Zagora.
4. **Pavlov, D.**, Eftimov, M., Tzaneva, M., Nashar, M., Kalchev, K., Ivanova, D., Valcheva-Kuzmanova, S. 2013. Hepatoprotective and gastroprotective effects of aqueous infusion from *Cotinus coggygria* leaves in rats. XI International Medical scientific conference for students and young doctors, 16-19 October 2013, Pleven.
5. **Pavlov, D.**, Eftimov, M., Tzaneva, M., Nashar, M., Kalchev, K., Ivanova, D., Valcheva-Kuzmanova, S. 2013. Hepatoprotective and gastroprotective effects of aqueous infusion from *Cotinus coggygria* leaves in rats. International conference on natural products utilization: From plants to pharmacy shelf, 3-6 November 2013, Bansko.
6. Ivanova, D., Kiselova-Kaneva, Y., Tasinov, O., Vankova, D., **Pavlov, D.**, Pasheva, M. 2013. Cell cultures as a model for evaluation of biological activities of medicinal plants. International conference on natural products utilization: From plants to pharmacy shelf, 3-6 November 2013, Bansko.
7. **Pavlov, D.**, Eftimov, M., Tzaneva, M., Nashar, M., Ivanova, D., Valcheva-Kuzmanova, S. 2014. Gastroprotective and

hepatoprotective effects of aqueous infusion from *Cotinus coggygia* leaves in rats. International Congress of Medical Sciences, 8-11 May 2014, Sofia.

8. Nashar, M., Kiselova-Kaneva, Y., Tasinov, O., **Pavlov, D.**, Valcheva-Kuzmanova, S., Eftimov, M., Tzaneva, M., Ivanova, D. 2014. Evaluation of biological effects and therapeutic potential of medicinal plants: comparison of different scientific approaches. XXIV Annual Assembly of IMAB, 15-18 May 2014, Varna.
9. **Pavlov, D.**, Eftimov, M., Nashar, M., Tzaneva, M., Ivanova, D., Valcheva-Kuzmanova, S. 2014. Anti-inflammatory effect of aqueous infusion from *Cotinus coggygia* leaves in experimental model of carrageenan-induced rat paw oedema. First International Scientific Conference "Trakia Medical Days", 22-23 May 2014, Stara Zagora.

#### **Участия в национални научни форуми**

10. **Павлов, Д.**, Нашар, М., Иванов, Д., Иванова, Д. 2012. *In vitro* антиоксидантни свойства на извлеци от смрадлика (*Cotinus coggygia*). Заключителна конференция „Сътрудничество, наука и социално-икономическо развитие“, Секция „Медицина и дентална медицина“, 26 октомври 2012 г., Варна.
11. Ivanova, D., **Pavlov, D.**, Eftimov, M., Kalchev, K., Nashar, M., Tzaneva, M., Valcheva-Kuzmanova, S. 2012. Subchronic toxicity study of ethanol infusion from *Cotinus coggygia* wood in rats. Младежка научна конференция „Климентови дни“, 22-23 ноември 2012 г., София.
12. **Павлов, Д.**, Цанева, М., Вълчева-Кузманова, С., Нашар, М., Калчев, К., Ефтимов, М., Иванова, Д. 2013. Биохимично и хистопатологично проучване на протективния ефект на воден извлек от листа на смрадлика (*Cotinus coggygia*) в модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност при плъхове. Конкурс „Наука и младост“, 18-20 април 2013 г., Пловдив.
13. **Павлов, Д.**, Цанева, М., Калчев, К., Нашар, М., Ефтимов, М., Иванова, Д., Вълчева-Кузманова, С. 2013. Сравнително проучване на протективния ефект на воден извлек от листа

- и етанолов извлек от дървесина на смрадлика (*Cotinus coggygia*) в модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност при плъхове. XI Национален конгрес по патология, 16-18 май 2013 г., Шумен.
14. Пашева, М., Нашар, М., **Павлов, Д.**, Славова, С., Иванов, Д., Иванова, Д. 2013. Антиоксидантен капацитет на различни видове дървесини, традиционно използвани за оцветяването на високо-алкохолни напитки в България. X Национална конференция по медицинска биология, 25-27 октомври 2013 г., Плевен.
  15. **Павлов, Д.**, Ефтимов, М., Цанева, М., Нашар, М., Иванова, Д., Вълчева-Кузманова, С. 2014. Гастропротективен ефект на воден извлек от листа на смрадлика (*Cotinus coggygia*) в модел на индометацин-индуцирана улцерогенеза при плъхове. Конкурс „Наука и младост“, 10-12 април 2014 г., Пловдив.
  16. **Pavlov, D.**, Novakovic, M., Eftimov, M., Jadranin, M., Nashar, M., Tzaneva, M., Trifunovic, S., Valcheva-Kuzmanova, S., Ivanova, D. 2014. Ethanol extract from the heartwood of *Cotinus coggygia*, and its major bioactive phytochemical constituents fustin and sulfuretin modulate indomethacin-induced gastric ulcerogenesis in rats. VII Национален конгрес по фармакология, 17-19 октомври 2014, Плевен.
  17. **Pavlov, D.**, Valcheva-Kusmanova, S., Tzaneva, M., Garrard, J., Novakovich, M., Nashar, M., Eftimov, M., Kalchev, K., Ignatova, S., Jadranin, M., Kobakova, I., Trifunovic, S., Ivanova, D. 2014. *In vivo* antioxidant properties of *Cotinus coggygia* extracts. Научно-практическа конференция „Предизвикателства при обучението на магистър-фармацевти“, 1 ноември 2014 г., Варна.
  18. **Pavlov, D.**, Eftimov, M., Nashar, M., Tzaneva, M., Ivanova, D., Valcheva-Kuzmanova, S. 2014. Anti-inflammatory properties of aqueous infusion from *Cotinus coggygia* leaves in rats. Научно-практическа конференция „Предизвикателства при обучението на магистър-фармацевти“, 1 ноември 2014 г., Варна.