

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„Проф. Д-р. Параскев Стоянов”, гр. Варна
ФАКУЛТЕТ ПО ФАРМАЦИЯ
КАТЕДРА ПО БИОХИМИЯ, МОЛЕКУЛНА МЕДИЦИНА И
НУТРИГЕНОМИКА

Оскан Бахидинов Тасинов

**Проучване на антиоксидантното,
антиобезитното и противодиабетно действие на
екстракти от плодове на *Sambucus ebulus*
in vitro и *in vivo***

АВТОРЕФЕРАТ

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА
ОБРАЗОВАТЕЛНАТА И НАУЧНА СТЕПЕН
“ДОКТОР”**

ПО НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ: 01.06.10 – БИОХИМИЯ

**Научен ръководител:
Проф. дбн Диана Иванова**

**Официални рецензенти:
Проф. Татяна Влайкова, дб
Доц. Татяна Янкова, дб**

**ВАРНА
2015**

Дисертационният труд е обсъден на заседание на разширен катедрен съвет на Катедрата по Биохимия, молекулна медицина и нутригеномика при Медицински университет – Варна и насочен за защита пред научно жури.

Дисертационният труд обхваща 164 страници, 77 фигури, 1 схема и 7 таблици. Цитирани са 382 заглавия.

Дисертантът е асистент в Катедрата по Биохимия, молекулна медицина и нутригеномика при Медицински университет – Варна.

Експерименталната работа по дисертационния труд е извършена в:

- Катедрата по биохимия, молекулна медицина и нутригеномика при Медицински университет – Варна;
- Научено-изследователски Център по Молекулна медицина и хронични заболявания (CIMUS), при Университета на Сантяго де Компостела, Испания, под прякото ръководство на Проф. Рубен Ногиерес и Проф. Карлос Диегес, 25.01-25.02.2014г.

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на 23.03.2015 година от 10:00 часа в трета аудитория на ректората на Медицински университет – Варна.

Съдържание

1. Въведение	4
2. Цел и задачи.....	5
2.1. Цел.....	5
2.2. Задачи	5
3. Материали и методи.....	6
3.1. Материали	6
3.2. Методи	6
4. Резултати и обсъждане.....	12
4.1. Фитохимичен анализ на различни екстракти от <i>Sambucus ebulus</i>	12
4.2. Определяне на цитотоксичността на използваните в експериментите с клетъчни култури екстракти от <i>Sambucus ebulus</i> , LPS и салицилова киселина.....	14
4.3. Изследване на протективното действие на плодове от <i>Sambucus ebulus</i> при клетъчни култури в модели на t-ButOОН индуциран оксидативен стрес и LPS и етанол индуцирано възпаление	16
4.4. Изследване на влиянието на чай от плодове на <i>Sambucus ebulus</i> върху антропометрични и биохимични показатели, параметри на оксидативен стрес и TAC в серуми от здрави доброволци.....	47
5. Заключение	60
6. Изводи и приноси.....	61
6.1. Изводи.....	61
6.2. Приноси	63
7. Списък на често използваните съкращения	64
8. Списък на публикации и участия във връзка с дисертационния труд	65
8.1. Публикации свързани с дисертационния труд:	65
8.2. Участия в международни научни форуми свързани с дисертационния труд:.....	65
9. Финансиране.....	66

1. Въведение

От древни времена растенията са неизменна част от нашата диета. Те са суровина за производството на разнообразни лекарства и хранителни добавки, които допринасят за поддържането на здравето.

Научният интерес към лечебните растения нарастна изключително много в последните десетилетия, като с напредването на изследователските технологии се изясни, че билките са богати на различни биологично активни вещества: полифеноли, флавоноиди, антоциани, танини, витамини, гликозиди, пептиди и много други. С това разнообразие от компоненти в растенията се обяснява и тяхното многостранно приложение.

С времето е станало известно благотворното действие на различни чайове и отвари, приготвени от лечебни растения при някои заболявания и за укрепване на имунната система. В последните години се обръща голямо внимание на нуждата от подобряване на хранителните навици в борбата със социално значими заболявания. При това все повече хора включват в диетата си храни и хранителни добавки от растителен произход, но за механизмите на тяхното действие все още малко се знае. На билките се приписват множество лечебни ефекти, на които разчита до голяма степен и съвременната фармация. С развитието на научните изследвания се разкрива все по-големият потенциал на растенията при лечението на редица заболявания, свързани с развитието на оксидативен стрес и възпаление като затлъстяване, инсулинова резистентност, диабет и комплексното състояние метаболитен синдром.

Нискостепенното възпаление характерно при затлъстяване води до потискане на инсулиновата сигнализация и в следствие до инсулинова резистентност. Тези усложнения често прерастват в заболявания като диабет и метаболитен синдром. Подобни състояния са съпроводени и от множество други усложнения като високо кръвно налягане, хиперлипидемия атеросклероза и инфаркт и други сърдечно-съдови заболявания. Обръщането на все по-голямо внимание на противовъзпалителната терапия при затлъстяване, диабет тип 2 и комплексното състояние на метаболитен синдром е изключително важен момент при подобен тип лечение. Това се превръща в една от основните насоки в съвременните стратегии за превенция и терапия на тези състояния.

2. Цел и задачи

2.1. Цел

Основна цел на настоящият научен труд е да се анализира протективното, антиоксидантно, антиобезитно и противодиабетно действие на екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* L. в различни експериментални модели *in vitro* и *in vivo*.

2.2. Задачи

За изпълнението на поставената цел бе необходимо изпълнението на следните задачи:

1. Извършване на фитохимичен анализ на различни екстракти от плодове на *S. ebulus* L.:
 - определяне концентрацията на тотални полифеноли (ТП), антоцианини (КА), антиоксидантната активност (АОА) на екстракти от плодове на *S. ebulus* L. в зависимост от вида и концентрацията на екстрагента;
 - 2. Определяне на цитотоксичността на използваните в експериментите с клетъчни култури екстракти от *S. ebulus* L.;
 - 3. Изследване на протективното действие на екстракти от плодове на *S. ebulus* L. върху 3T3-L1 преадипоцитни клетки в условия на t-ButOОН индуциран оксидативен стрес, чрез анализ на генната експресия на белтъци от вътреклетъчната антиоксидантна (АО) защита и такива свързани с контрола и протичането на възпалителен процес;
 - 4. Изследване на протективното действие на:
 - а) Етилацетатна фракция на тотален метанолен екстракт от плодове на *S. ebulus* L. върху 3T3-L1 преадипоцитни клетки в условия на етанол-индуцирано възпаление чрез анализ на генната експресия на белтъци от вътреклетъчната АО защита и такива, свързани с контрола и протичането на възпалителен процес;
 - б) Воден екстракт от плодове на *S. ebulus* L. върху J744A.1 макрофаги в условия на липополизахарид-индуцирано възпаление чрез анализ на генната експресия на белтъци от вътреклетъчната АО защита и такива, свързани с контрола и протичането на възпалителен процес; нивата на провъзпалителни белтъци и такива, свързани с контрола и протичането на ER стрес;
 - 5. Изследване на влиянието на водна инфузия от плодове на *S. ebulus* L. върху здрави доброволци, чрез анализиране на
 - антиоксидантната активност на серуми от здрави доброволци;
 - ефект на воден извлек върху нивата на кръвна захар;
 - ефект на воден извлек върху нивата на липиди в серуми на здрави доброволци;
 - белтъчните нива на провъзпалителни цитокини и адипокини и генната експресия на някои от тях.

3. Материали и методи

3.1. Материали

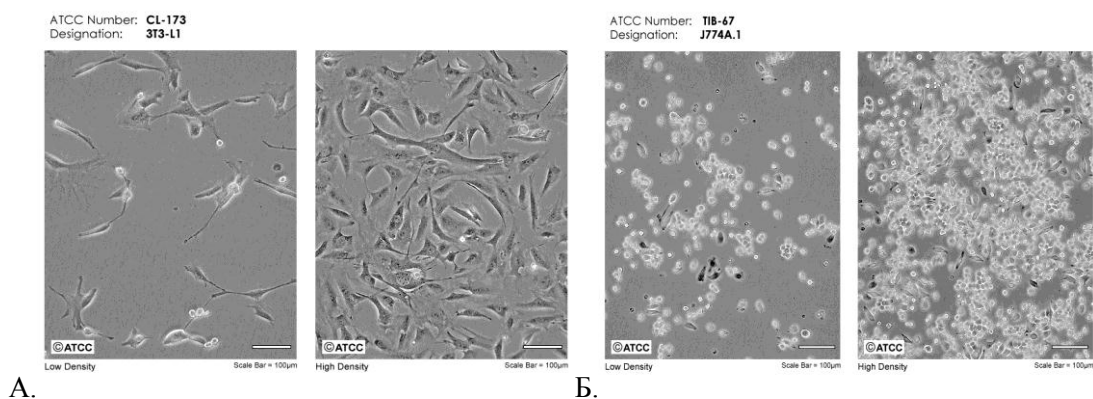
3.1.1. Растителен материал

Растителният материал е закупен от търговската мрежа. Брането е извършено в периода на узряване на плодовете на бязак август-септември, след което са сушени на сянка.

3.1.2. Клетъчна линия

3T3-L1 (фиг. 1, А) – L1 е непрекъснат субклон на 3T3 (Swiss albino) (*Mus musculus*), получен чрез клонална изолация. Клетките са недиференцирани и са с фибробластна морфология.

J774A.1 (фиг. 1, Б) е моноцитно-макрофажна миша (*Mus musculus*) клетъчна линия. Клетките са с макрофажна морфология и са диференцирани.



Фиг. 1. А. 3T3-L1 и Б. J774A.1 клетъчни линии, използвани в изследването

3.2. Методи

3.2.1. Приготвяне на воден и водно-етанолови екстракти

Изсушен растителен материал се смилва на фина пудра с електрическа мелничка. 150 mg смлян растителен материал се екстрахира трикратно за по три минути при непрекъснато разбъркване при стайна температура с 20%, 40%, 60% и 80% (v/v) абсолютен етанол/вода за приготвяне на водно-етанолов екстракт и само с дестилирана вода за приготвянето на воден екстракт. При всяко екстрахиране съотношението растителен материал/екстрагент е 1:20 w/v (150 mg:3ml). След центрофугиране (5min, 3500rpm) супернатантите от всяка от екстракционните стъпки се обединяват (2.1ml от първата, 2.7ml от втората и 3ml от третата - общо 7.8 ml) и довеждат до общ обем 15ml със съответния екстрагент (20%, 40%, 60% и 80% (v/v) – абсолютен етанол/вода или само дестилирана вода.

Водно-алкохолни и воден екстракти за измерване протективното действие на *Sambucus ebulus* в условия на оксидативен стрес при клетъчни култури се приготвя, както е описано по-горе, като при довеждането на екстрактите до общ обем от 15 ml вместо вода се използва PBS (pH=7.4).

3.2.2. Приготвяне на воден извлек (чай) от плодове на *Sambucus ebulus* за консумация от здрави доброволци

Билковият чай от цели плодове на бязак се приготвя според указанията на производителя (които следват известна от народната медицина рецепта), като 2.5g плодове се варят 10min в 300ml минерална вода, след което се оставя да престои 30min. При приготвянето на чая не се използва захар или други добавки. Така приготвеният чай е готов за консумация.

3.2.3. Приготвяне на етанолен разтвор от етилацетатна фракция от плодове на *Sambucus ebulus*

Фракционирането е направено от колегите в Института по органична химия с център по фитохимия, БАН, като част от съвместен проект към Фонд научни изследвания при МОН. За приготвяне на етанолен разтвор от етилацетатна фракция от плодове на *Sambucus ebulus* L. (SEF), използван в изследванията с клетъчни култури, изсушената етилацетатна фракция от плодове на бъзак беше разтворена в съотношение 10 mg/ml разтворител (0,25 ml абсолютен етанол + 0,9% NaCl до краен обем 1ml). Поради употребата на етанол за разтваряне на етилацетатната фракция, при експериментите клетките бяха третирани и със съответните контролни концентрации на етанол.

3.2.4. Определяне на антиоксидантна активност на екстракти

Антиоксидантната активност (АОА) на водните и водно-алкохолните екстракти е определена чрез АВТС [2,2'-азинобис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонова киселина)] катион радикал деколоризационен метод (Re et al., 1999). Данните за АОА са представени като mM еквиваленти пикочна киселина (mM UAE). Измерванията са извършени на спектрофотометър (Camspec M501).

3.2.5. Определяне на съдържанието на тотални полифеноли в екстракти

Полифенолно съдържание е измерено посредством спектрофотометричния метод с реактива на Folin-Ciocalteu на Singleton и Rossi (1965). Концентрацията на полифенолите е представена като mM еквиваленти кверцетин (mM QE). Измерванията са извършени на спектрофотометър (Camspec M501).

3.2.6. Определяне концентрацията на антоцианини (КА) в екстракти чрез рН-диференциален метод

Съдържанието на антоцианини е измерено чрез спектрофотометричен рН-диференциален метод (Giusti R. E. and Wrolstad R. E., 2001). Съдържанието на антоцианини е представено в mg/l цианидин-3-глюкозидни еквиваленти.

3.2.7. МТТ тест за цитотоксичност

Наименованието на теста идва от абривиатурата, използвана за означаване на съединението 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ). Методът за определяне на цитотоксичността на различни агенти се основава на способността на ензимните системи на жизнеспособните клетки да редуцират това съединение, което е с жълт цвят, до пурпурно-виолетов формазан. Жизнеността на третираните клетки се определя като процент от нетретираната контрола, чиято жизнениост се приема за 100%.

3.2.8. Описание на експерименталните модели на клетъчни култури, използвани при *in vitro* изследванията на потенциалното антиоксидантно, противовъзпалително и противодиабетно действие на екстракти от *Sambucus ebulus*

Използваните експериментални модели на клетъчни култури бяха три:

- модел на третичен бутилов хидропероксид (t-ButOОН) индуциран оксидативен стрес при 3Т3-L1 миши преадипоцитни клетки;
- модел на етанол (EtOH) индуцирано възпаление при 3Т3-L1 миши преадипоцити;
- модел на индуцирано възпаление с LPS от стандартен щам на *Escherichia coli* серотип 026:В6 при J774А.1 миши макрофаги.

3.2.9. Субкултивиране на клетъчни култури

Субкултивирането на клетъчните култури следваше следната процедура:

Клетъчните култури се субкултивират в 75 cm² фласки. Не се допуска клетките да превишат 70-80% конfluентност или гъстота от 6x10⁴кл/мл. След отстраняване на предходната хранителна среда клетките се промиват с 2 ml темпериран при 37°C PBS. След отстраняване на буфера клетките се трипсинизират за 2-3 min. Добавя се свежа хранителна среда и клетките се събират със скрейпър. След преброяване клетките се засяват с необходимата гъстота за експеримент или за последващо субкултивиране. Клетъчните култури се инкубират винаги на тъмно при 37°C, 5% CO₂.

3.2.10. Определяне нивото на генна експресия

За определяне нивото на генна експресия на избрани гени в клетъчни култури и мононуклеарни клетки от периферна кръв (Buffy coat) беше използван двустъпков количествен Real-Time PCR.

3.2.10.1. Изолитане на мононуклеарни клетки от периферна кръв (Buffy coat)

За отделиането на мононуклеарни клетки от хепаринизирана цяла кръв се прилага центрофугиране за 15min при 4000g, полученият междинен слой (бяла пелена, Buffy coat) се отнема и използва за последващо изолитане на РНК. Слойт от мононуклеарни клетки съдържа основно бели кръвни клетки (лимфоцити, моноцити и макрофаги).

3.2.10.2. Изолитане на РНК от клетки

Изолитането на РНК от клетъчни култури и мононуклеарни клетки от периферна кръв е извършено с помощта на TriReagent[®], като лабораторният протокол по изолитането следваше указанията на производителя.

3.2.10.3. Обратна транскрипция – RT-PCR

Първата стъпка при количествен Real-Time PCR анализ е осъществяване на обратна транскрипция на изолитаната РНК и синтез на кДНК.

РНК (0,1-5 µg) бе обратно транскрибирана с помощта на Revertaid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit, съдържащ олиго (dT)₁₈ праймер и RevertAid[™] обратна транскриптаза. Реакцията беше провеждана според указанията на производителя, при краен обем на реакционната смес 10 µl.

3.2.10.4. Real Time qPCR

Втората стъпка при количествен Real-Time PCR анализ е амплификация на кДНК в реално време – Real-Time PCR.

Нуклеотидната последователност на праймерите, използвани за анализ на нивото на генната експресия на избрани гени, са представени в таблица 1.

Таблица 1 Олигонуклеотидна последователност на използваните при Real Time-qPCR анализ А. миши (*Mus musculus*) и Б. човешки (*Homo sapiens*) праймери.

А.

Mus musculus	β-actin (Sigma-Aldrich, Germany)
Forward (<i>праймер</i>)	5'-ACGGCCAGGTCATCACTATTG-3'
Reverse (<i>праймер</i>)	5'-CAAGAAGGAAGGCTGGAAAAG-3'
	GPx-4 (Sigma-Aldrich, Germany)
Forward (<i>праймер</i>)	5'-CCCCACTGCGCTCATGA-3'
Reverse (<i>праймер</i>)	5'-GGCACACCGGAGACCAAA-3'
	GCLc (Alpha DNA, Canada)
Forward (<i>праймер</i>)	5'-AATGGAGGCGATGTTCTTGAG-3'
Reverse (<i>праймер</i>)	5'-CAGAGGGTCGGATGGTTGG-3'
	COX-2 (Alpha DNA, Canada)
Forward (<i>праймер</i>)	5'-TGAGCAACTATTCCAAACCAGC- 3'
Reverse (<i>праймер</i>)	5'-GCACGTAGTCTTCGATCACTATC- 3'
	iNOS (Alpha DNA, Canada)
Forward (<i>праймер</i>)	5'-GGCAGCCTGTGAGACCTTTG- 3'
Reverse (<i>праймер</i>)	5'-GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC- 3'
	TNFα (Alpha DNA, Canada)
Forward (<i>праймер</i>)	5'-CCCTCACACTCAGATCATCTTCT- 3'
Reverse (<i>праймер</i>)	5'-GCTACGACGTGGGCTACAG- 3'
	IL-6 (Alpha DNA, Canada)
Forward (<i>праймер</i>)	5'-GAGTTGTGCAATGGCAATTCTG- 3'
Reverse (<i>праймер</i>)	5'-GCAAGTGCATCATCGTTGTTTCAT- 3'
	IL-1β (Alpha DNA, Canada)
Forward (<i>праймер</i>)	5'-TTCAGGCAGGCAGTATCACTC- 3'
Reverse (<i>праймер</i>)	5'-CCACGGGAAAGACACAGGTAG- 3'
	AdipoQ (Alpha DNA, Canada)
Forward (<i>праймер</i>)	5'-GTTCCCAATGTACCCATTCGC- 3'
Reverse (<i>праймер</i>)	5'-TGCTGCCGTCATAATGATTCTG- 3'
	MCP-1 (Bioneer,)
Forward (<i>праймер</i>)	5'-AGGTGTCCCAAAGAAGCTGTA- 3'
Reverse (<i>праймер</i>)	5'-ATGTCTGGACCCATTCCTTCT- 3'
	NFKB1 (NF kappa B, p50) (Bioneer,)
Forward (<i>праймер</i>)	5'-ATGGCAGACGATGATCCCTAC- 3'
Reverse (<i>праймер</i>)	5'-TGTTGACAGTGGTATTTCTGGTG- 3'
	Sirt-1 (Bioneer,)
Forward (<i>праймер</i>)	5'-TGATTGGCACCGATCCTCG- 3'
Reverse (<i>праймер</i>)	5'-CCACAGCGTCATATCATCCAG- 3'
	IL1-RN (Invitrogene,)
Forward (<i>праймер</i>)	5'- GTCATTGCTGGGTACTTACAA- 3'
Reverse (<i>праймер</i>)	5'-CCAGACTTGGCACAAAGACAGG- 3'
	Icam-1 (Invitrogene,)
Forward (<i>праймер</i>)	5'-GACCCCAAGGAGATCACATTC- 3'
Reverse (<i>праймер</i>)	5'-GAAGATCGAAAGTCCGGA- 3'
	Noxo1 (NADPH oxidase organizer 1) (Invitrogene,)
Forward (<i>праймер</i>)	5'-AGAGGAGCCCTTATCCCAACC- 3'
Reverse (<i>праймер</i>)	5'-TGTCCAGAATTTCTTGAGCCTTG- 3'
	aP2 α (Invitrogene,)
Forward (<i>праймер</i>)	5'-AGT GAA AAC TTC GAT GAT TAC ATG AA-3'
Reverse (<i>праймер</i>)	5'-GCC TGC CAC TTT CCT TGT G-3'

Б.

Homo sapiens	IL-6 (Bioneer,)
Forward (<i>праймер</i>)	5'-AAACAACCTGAACCTTCCAAAGA- 3'
Reverse (<i>праймер</i>)	5'-GCAAGTCTCCTCATTGAATCCA- 3'
	GCLc (Bioneer,)
Forward (<i>праймер</i>)	5'-GGAGGAAACCAAGCGCCAT- 3'
Reverse (<i>праймер</i>)	5'-CTTGACGGCGTGGTAGATGT- 3'
	ICAM (Bioneer,)
Forward (<i>праймер</i>)	5'-TTGGGCATAGAGACCCCGTT- 3'
Reverse (<i>праймер</i>)	5'-GCACATTGCTCAGTTCATACACC- 3'
	SIRT-1 (Invitrogen,)
Forward (<i>праймер</i>)	5'-TGTGTCATAGGTTAGGTGGTGA- 3'
Reverse (<i>праймер</i>)	5'-AGCCAATTCTTTTGTGTTCGTG- 3'

3.2.11. Определяне на вътреклетъчните нива на определени белтъци чрез Western blot анализ

Нивата и активността на определени белтъци бяха определени чрез Western blot (белтъчен имуноблот) анализ, който бе проведен в Изследвателският център по Молекулна медицина и Хронични заболявания (CIMUS) при Университета на Сантяго де Компостела, Испания под прякото ръководство на Проф. Карлос Диегес и Проф. Д-р Рубен Ногиерес от 25.01 до 25.02.2014г. То бе резултат от едномесечен научен обмен на докторанта по Проект BG051PO001/3.3-05-001 „Наука и Бизнес“ на МОН, и подкрепен от ЕСФ. Анализът следваше стъпките в реда описан по-долу:

Изолиране на тотален белтък

За изолирането на белтък бе използван Pierce® IP лизисен буфер, като бяха следвани стъпките описани от производителя.

Определяне на общата белтъчна концентрация в проба

Белтъчната концентрация във всяка проба бе определяна непосредствено преди електрофореза по метода на Брадфорд с търговски кит.

SDS-PAGE

Приготвя се 8% полиакриламиден гел. От всяка проба се зареждат 20µg белтък. Вертикалната електрофореза продължава до ефективното разделяне на белтъците (20min/85V, 45min/110V), електрофоретичната клетка се зарежда с работен буфер.

Трансфер на протеин върху PVDF мембрана (блотинг)

След електрофоретичното разделяне на белтъците следва трансфер върху PVDF мембрана. Блотингът продължава 1 час и 40 минути при 0,25A.

Инкубиране с белтък специфично антитяло

Инкубиране за 1 час със съответният блокиращ разтвор (5% млечен протеин или 3% телешки серумен албумин, BSA).Трикратно промиване с TBS-Tx1. Инкубация с първично антитяло. Трикратно промиване отново с TBS-Tx1. Инкубация с вторично антитяло.

Хемилуминисцентна детекция на белтъчните нива

Промива трикратно с TBS-Tx1. Инкубиране с луминол:пероксидаза (1:1) Хемилуминисценцията на пробите се отчита като се улавя върху фотофилм. След проявяването му той се сканира и анализира денситометрично за определя относителните нива на прицелният белтък в анализирания проба. Като вътрешна контрола бе използван β-актин.

3.2.12. Схема за изследване на влиянието на чай от плодове на бъзак върху здрави доброволци

Изследването бе реализирано след одобрение от комисията по етика към Медицински университет “Проф. д-р Параскев Стоянов” град Варна (протокол No18/08.03.2012) в съответствие с декларацията от Хелзинки (1964г.) и подписване на информирано съгласие от страна на участниците. В изследването бяха включени 21 здрави доброволци, сред които 15 жени и 6 мъже на възраст между 20 и 58 години. В периода от 17.04.2012г. до 17.05.2012г. всеки ден участниците изпиваха по 200 ml чай от бъзак, като добавка към ежедневната им диета. Преди началото и в края

на периода на всеки участник бе взета венозна кръв сутрин на гладно. Серум и плазма бяха отделени и веднага след това една част бе замразена на -80°C , а друга използвана за биохимични изследвания. Всеки един от участниците бе контрола сам за себе си в края на изследването.

3.2.13. Определяне на тотален антиоксидантен статус на серум

Антиоксидантният статус (ТАС) на серум от здрави доброволци е определен чрез ABTS катион радикал деколоризационен метод (Re et al., 1999).

3.2.14. Определяне на количеството тотални тиоли в серум.

В основата на метода за определяне на концентрацията на тоталните тиоли стои способността на реактива на Ellman (5,5 дитио-бис(2-нитробензоена киселина, съкр. DTNB) да взаимодейства с тиолатния анион. Като стандарт беше използван разтвор на редуциран глутатион.

3.2.15. Определяне на общ холестерол, HDL и LDL холестерол, трацилглицероли, пикочна киселина и глюкоза в кръвен серум

Определянето на концентрацията на общ холестерол, HDL и LDL холестерол, трацилглицероли, пикочна киселина и глюкоза в кръвен серум бе извършено с помощта на готови търговски китове.

3.2.16. Определяне на количеството на GSH в лизати от еритроцити

Количеството на GSH в лизати от еритроцити бе определен с реактива на Ellman.

3.2.17. Определяне нивата на плазмени белтъци

Определянето на нивата на плазмени белтъци при здрави доброволци бе извършено чрез имунологичен ELISA метод с помощта на готови търговски китове.

3.2.18. Статистическа обработка на данните

Получените стойности са представени като средна стойност от минимум три измервания \pm стандартна грешка на средната стойност (Mean \pm SEM) или \pm стандартното отклонение (Mean \pm SD). Данните са статистически обработени с one way ANOVA, при ниво на достоверност $p < 0.05$ и са сравнени със Student's *t*-тест. Обработката на данните беше извършена с помощта на статистическия софтуерен продукт GraphPad Prism (Ver. 5.0 GraphPad Software, Inc.).

4. Резултати и обсъждане

4.1. Фитохимичен анализ на различни екстракти от *Sambucus ebulus*

4.1.1. Определяне концентрацията на тотални полифеноли (ТП) в екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* в зависимост от вида и концентрацията на екстрагента

Най-високо съдържание на ТП има във водния екстракт (1.73 mM QE), следван от 20% водно етанолов екстракт (1.68 mM QE). Увеличаването на концентрацията на етанола като екстрагент до 60% в екстракционния разтвор се отрази върху съдържанието на ТП в съответните екстракти като доведе до слабо понижение. Същата тенденция се запази и бе много по-изразена при 80%-ния етанолов екстракт, където съдържанието на ТП намалява с около 41% спрямо съдържанието им във водния екстракт.

4.1.2. Определяне концентрацията на антоцианини (КА) в екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* в зависимост от вида и концентрацията на екстрагента

Зависимостта между концентрацията на етанола като екстрагент от 0% (воден екстракт) до 60% (водно-етанолов екстракт) е пропорционална на количеството на екстрахираните антоцианини. Най-високо е съдържанието на антоцианини в 60% водно-етанолов екстракт (141.97 mg/l), следван от 40%-ния (140.74 mg/l). Прилагането на 80% етанол като екстрагент доведе до понижение на КА с около 17% спрямо 60% етанолов екстракт.

4.1.3. Определяне антиоксидантната активност (АОА) на екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* в зависимост от вида и концентрацията на екстрагента. Зависимост на АОА от концентрацията на ТП и КА

С увеличаване на концентрацията на етанола до 60% в екстракционния разтвор *in vitro* АОА на съответните екстракти се увеличава. С най-високи са стойности на АОА се отличават водният (5.50 mM UAE), следван от 40% (5.43 mM UAE) и 60% (5.42 mM UAE) етанолови екстракти.

Таблица 2 Стойности на АОА, концентрация на ТП и КА. Резултатите са представени \pm SEM.

Легенда: видове екстракти 20Е, 40Е, 60Е и 80Е съответно 20%, 40%, 60% и 80% етанолов екстракт; АQ – воден екстракт (0% етанолов екстракт). Представени са средните стойности за всяко едно измерване \pm SEM.

А.	АОА [mM UAE]	ТП [mM QE]	ТП [mg QE/g сухо тегло]	КА [mg/l]	КА [mg/g сухо тегло]	КА/ТП [%]
AQ	5.50 \pm 0.023	1.73 \pm 0.008	52.19 \pm 0.299	128.01 \pm 0.315	12.80 \pm 0.032	24.5
20E	5.32 \pm 0.011	1.68 \pm 0.006	50.92 \pm 0.188	132.50 \pm 1.217	13.25 \pm 0.122	26
40E	5.43 \pm 0.013	1.62 \pm 0.009	48.97 \pm 0.256	140.74 \pm 0.507	14.07 \pm 0.051	28.7
60E	5.42 \pm 0.013	1.60 \pm 0.006	48.45 \pm 0.206	141.97 \pm 0.783	14.20 \pm 0.078	29.3
80E	3.73 \pm 0.021	1.02 \pm 0.003	30.89 \pm 0.112	117.23 \pm 0.452	11.72 \pm 0.045	37.9

Б.	Корелация (r^2)
АОА/ТП	0.98
АОА/КА	0.81

Прилагането на 60% и/или по-ниска концентрация на етанол като екстрагент, повишава както степента на екстракция на антоцианини, така и *in vitro* АОА на съответните екстракти. Намалването на количеството антоцианини при екстракцията с 80% етанол се отразява негативно и на *in vitro* АОА на екстракта (таблица 2, А).

Най-висока АОА (5.50 mM UAE) и съдържание на ТП (1.73 mM QE) притежава водният екстракт (таблица 2, А). В научен доклад от 2008 година се анализира съдържанието на ТП и фенолни киселини, както и АОА на воден и метанолов екстракти от плодове на бъзак където се посочва по-голямо съдържание на ТП и по-висока АОА за водния екстракт в сравнение с водно-алкохолния (Ebrahimzadeh M.A. et al., 2008). Последното изследване подкрепя получените от нас резултати по отношение на АОА и съдържанието на ТП за водния и водно-етаноловите екстракти от растението.

Друг интересен факт, който се забелязва е, че с използването на все по-високи концентрации на етанол като екстрагент съотношението между екстрахираните антоцианини и полифеноли (КА/ТП) постепенно се увеличава (таблица 2, А). Антоцианините са растителни пигменти от групата на флаваноидите, които от своя страна се отнасят към полифенолите. Както е показано в таблица 2, А може да се види, че антоцианините в различните екстракти представляват средно около 29% от общото количество полифеноли.

Изследвания на други автори също показват корелацията между тоталното фенолно съдържание и *in vitro* АОА на водни и водно-алкохолни екстракти от различни растителни видове (а, б Kiselova et al., 2006; Hosseinimehr et al., 2007; Tosun et al., 2009; Piluzza & Bullitta, 2011).

Данните от математическия анализ показват високата степен на корелация между АОА и ТП, докато корелацията между АОА и КА е по-ниска (таблица 2, Б). Изхождайки от тези резултати може да се предположи, че различните екстракти от *Sambucus ebulus* дължат АОА си активност най-вече на съдържащите се в тях ТП, не малка част от които са и антоцианините.

Консумирането на различни растения като плодове и зеленчуци, техните семена, билки и техни екстракти, богати на флаваноиди, витамин С, Е, β -каротен, проантоцианидини, антоцианини и други съединения с потенциално антиоксидантно действие имат благотворно влияние при различни патологични състояния (Harborne and Williams, 2000; Tapiero et al., 2002). В заключение може да се приеме, че АОА и вероятно свързаните с нея благотворни ефекти върху здравето на екстрактите от бъзак, се дължат основно на съдържанието на ТП.

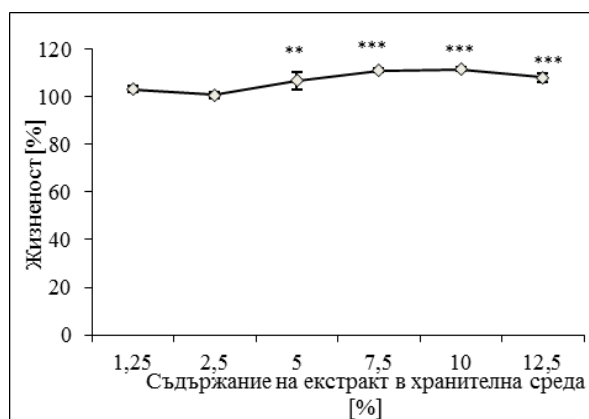
Предвид по-високата АОА и съдържание на ТП на водния екстракт, именно той бе избран за по-нататъшни изследвания, проведени върху 3T3-L1 преадипоцитни и J774A.1 макрофажни клетъчни линии при модели на индуциран оксидативен стрес и възпаление.

4.2. Определяне на цитотоксичността на използваните в експериментите с клетъчни култури екстракти от *Sambucus ebulus*, LPS и салицилова киселина.

За да се проучи действието на екстракти от бъзак *in vitro* върху преадипоцитната 3T3-L1 и макрофажна J774A.1 клетъчни линии, беше необходимо извършването на предварителен анализ за цитотоксичност на използваните в изследванията екстракти.

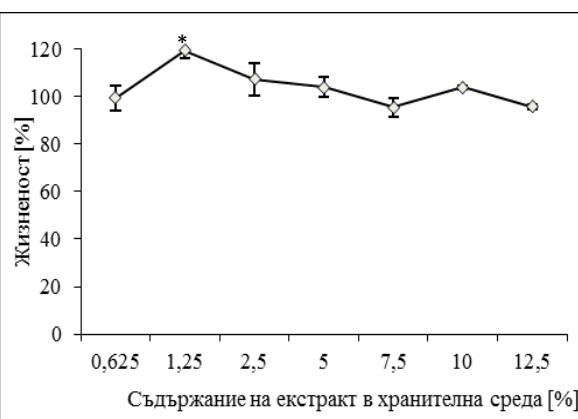
4.2.1. Определяне цитотоксичността на воден извлек от *Sambucus ebulus* върху 3T3-L1 преадипоцитна и J774A.1 макрофажна клетъчни линии

Фигури 2 и 3 представя резултатите за цитотоксичността на различни концентрации от воден екстракт от плодове на бъзак съответно при преадипоцити и макрофаги.



Фиг. 2 Резултати от анализа на цитотоксичност на различни концентрации на воден екстракт от *Sambucus ebulus* L при 3T3-L1 преадипоцитна клетъчна линия.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.



Фиг. 3 Резултати от анализа на цитотоксичност на различни концентрации на воден екстракт от *Sambucus ebulus* L при J774A.1 макрофажна клетъчна линия.

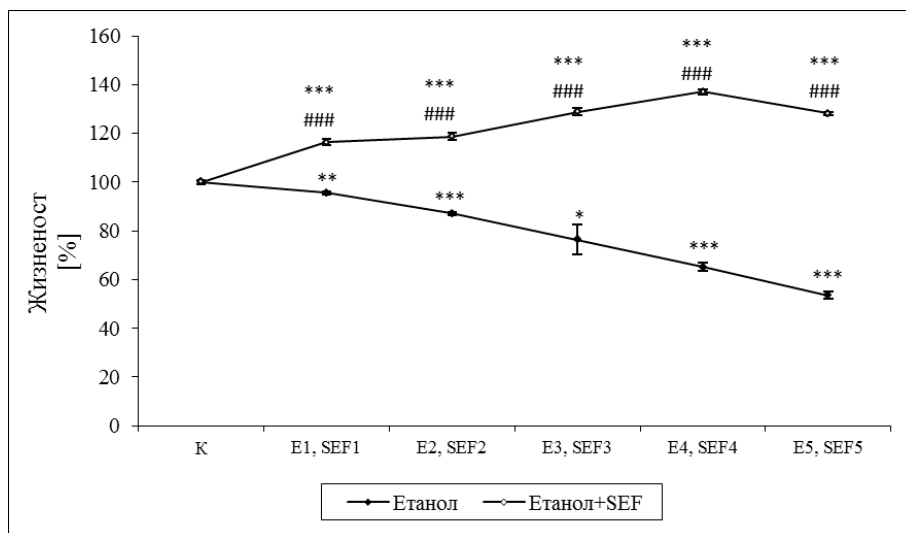
При нарастване на концентрациите на екстракта в диапазона от 1.25% до 2.5% не се наблюдава значимо изменение в жизнеността на клетките спрямо контролната група нетретирани преадипоцити (фиг. 2). Изследванията показаха, че броят на клетките третирани с екстракт от бъзак в концентрации от 5% до 12.5% се увеличил слабо (до ~110%), вероятно в резултат на активиране на клетъчната пролиферация. С нарастване на съдържанието на екстракт в хранителната среда не бе наблюдаван цитотоксичен ефект. За проучванията на протективното действие на екстракта върху преадипоцитни клетъчни култури, в условия на индуциран оксидативен стрес, бяха избрани концентрации от 2.5%, 5% и 10%.

С нарастване на концентрациите на екстракта в хранителна среда от 0,625% до 2.5% не се наблюдава цитотоксичен ефект върху макрофажна клетъчна култура (фиг. 3). Значимо повишение ($p < 0.05$) на клетъчната жизненост предизвика единствено концентрацията от 1,25% (до ~120%), дължащо се вероятно на биологично активни вещества в екстракта, повишаващи клетъчната пролиферация. За проучванията на протективното му действие върху J774A.1 макрофаги в условия на LPS индуцирано възпаление, бяха избрани същите концентрации (2,5%, 5% и 10%), избрани за експеримента с 3T3-L1 преадипоцити. Изборът на подобни концентрации бе продиктуван, както от настоящите резултати, така и от целта двата експеримента да бъдат сравними.

Подобни резултати са предвидими за медицински растения, чийто прием се препоръчва от народната медицина във вид на чай, както е плодът на бъзак. Подобни резултати са докладвани и за водни извлекци и на други лекарствени растения (Raheel et al., 2013). Вероятно съдържащите се във водния извлек биологично активни вещества повлияват пролиферацията на клетките. Ниските концентрации на водния извлек имат цитопротективен ефект, докато с увеличаване концентрацията му в хранителната среда жизнеността им слабо започва да намалява. Този ефект вероятно се дължи на активирането на каспазни каскади в клетките, водещи до апоптоза.

Наблюдавайки фигура 2 и 3 ясно можем да забележим дозозависимия ефект, който има водният извлек от плодове на бъзак върху клетъчната пролиферация.

4.2.2. Определяне цитотоксичността и анализ на цитопротективното действие на етилацетатна фракция от плодове на *Sambucus ebulus* върху 3T3-L1 преадипоцитна клетъчна линия



Фиг. 4 Резултати от анализа на цитотоксичност на различни концентрации на разтвор от етилацетатна фракция на бъзак и съответните контролни концентрации на етанол при 3T3-L1 преадипоцитна клетъчна линия. **К**-контролна група нетретиранни клетки; **E1**-0.125%, **E2**-0.25%, **E3**-0.375, **E4**-0.5%, **E5**-0.625% концентрация на етанол в хранителна среда; **SEF1**-0.005%, **SEF2**-0.01%, **SEF3**-0.015%, **SEF4**-0.02%, **SEF5**-0.025% w/v съдържание на етилацетатна фракция от плодове на бъзак в хранителна среда. *Представени са средните стойности за всяка една група ± SEM.*
 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ (vs. *К*-контрола нетретиранни клетки); $###p < 0.001$ (vs. съответното контролно третиране с етанол).

Предвид факта, че етилацетатната фракция е разтворена в етанол бе подготвен контролен разтвор (без съдържание на етилацетатна фракция от бъзак), за да бъде отчетено независимото действие на разтворителя върху третираните клетки. При третиране на преадипоцитите с етанол в концентрации от 0,125% до 0,625% съдържание в хранителна среда се забелязва статистически значимо, дозозависимо понижаване в жизнеността в сравнение с нетретираната контролна група (фиг. 4). Най-високата концентрация на етанол в хранителна среда (0,625%) доведе до 46% клетъчна смърт. Докато третирането с етилацетатна фракция от плодове на бъзак прояви цитопротективно действие, повишавайки клетъчната пролиферация с 37% в сравнение с нетретираната контролна група. Още по-силно потвърждение за цитопротективното действие на етилацетатна фракция дава сравнението с жизнеността на контролни групи клетки третиранни с етанол. Така например жизнеността на клетките, третиранни с 0,025% SEF съдържащ 0,625% етанол е с 75% по-висока от тази на клетките, третиранни с контролната етанолна концентрация (0,625%).

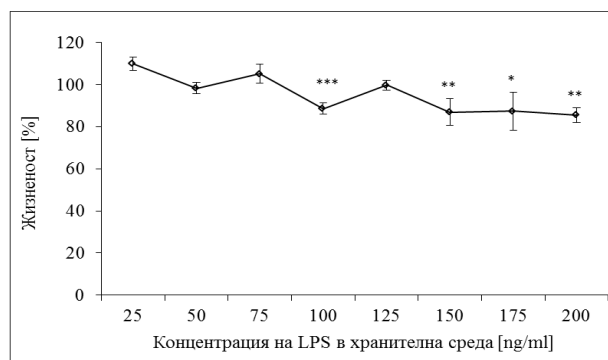
В литературата се споменава предимно за цитотоксичен ефект на различни растителни екстракти и то главно върху туморни клетки, като с това се обяснява евентуалното им противораково действие (Dzhambazov et al., 2002). Установяват цитотоксично действие на екстракт от *Clinopodium vulgare* върху A2058 (human metastatic melanoma), HEP-2 (epidermoid carcinoma, larynx, human) и L5178Y (mouse lymphoma) клетки. Екстракт от гинко билоба инхибира пролиферацията на човешки HepG2 и Hep3B клетки (Chao and Chu, 2004).

При адипоцити също се докладва предимно цитотоксично действие във връзка с антиадипогенна активност на екстракти. Водни и метанолови екстракти от *Capsicum annuum*, например са цитотоксични за 3T3-L1 адипоцити (Arumugam et al., 2008), а Sahib и съавтори (2011) установяват цитотоксично действие на екстрактите от други три растителни вида върху същата клетъчна линия.

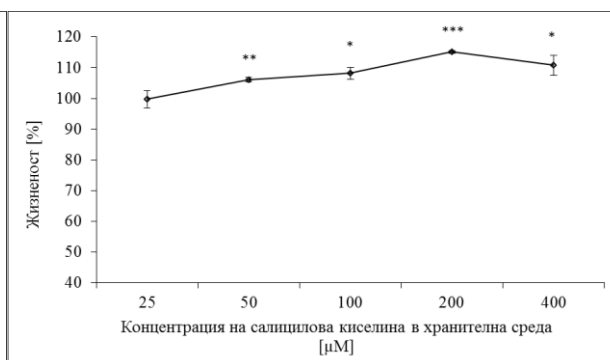
В настоящото изследване е установен протективен ефект на етилацетатната фракция от тотален метанолов екстракт от *S. ebulus* върху етанол-индуцирана цитотоксичност на 3T3-L1 клетки. Тази фракция е подбрана за анализ поради много високото си съдържание на полифеноли и силно изразена антиоксидантна активност (Kiselova et al., 2011). Настоящото проучване показва, че етанолът води до дозозависимо намаляване на клетъчната жизнениост и в концентрация от 0,625% е причина за смъртност на 46% от клетките. Едновременното третиране с етилацетатна фракция има за резултат увеличаване на жизнениостта до 137% в сравнение с контролната група, демонстрирайки цитопротективно действие на растението по отношение на преадипоцити.

Дали даден екстракт ще има цитотоксично или пролиферативно действие зависи от приложената концентрация. Ниски конценцентрации стимулират експресията на гени, свързани с пролиферация, а високи концентрации активират каспазни каскади, инициращи апоптоза (Kong et al., 2000). Ефектът се опоределя и от типа на екстрагента и веществата, съдържащи се в извлека или екстракта, както и от типа клетки.

4.2.3. Определяне цитотоксичността на използваните в експериментите с клетъчни култури LPS (026:B6, *Escherichia coli*) и салицилова киселина върху J774A.1 макрофажна клетъчна линия



Фиг. 5 Влияние на различни концентрации на LPS 026:B6 от *E. coli* върху жизнениостта на J774A.1 макрофажна клетъчна линия.



Фиг. 6 Влияние на различни концентрации на салицилова киселина [С6Н4(ОН)СООН] върху жизнениостта на J774A.1 макрофажна клетъчна линия.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.

При третиране на макрофажната клетъчна линия с нарастващи концентрации на LPS от 25ng/ml до 200ng/ml бе отчетено плавно статистически значимо ($p < 0.01$) понижаване на клетъчната пролиферация с 14,5% (фиг. 5).

Приложените концентрации на СК (от 25µM до 400µM) не проявиха цитотоксично действие върху третираните макрофаги. Ефектът от присъствието им в хранителната среда дори индуцира клетъчната пролиферация. Концентрацията от 200µM индуцира статистически значимо ($p < 0.001$) клетъчната пролиферация с близо 15% (фиг. 6). Използваната за следващите експерименти с клетъчни култури работна концентрация на СК в хранителна среда бе 100µM.

4.3. Изследване на протективното действие на плодове от *Sambucus ebulus* при клетъчни култури в модели на t-ButOОН индуциран оксидативен стрес и LPS и етанол индуцирано възпаление

4.3.1. Избор на експериментални модели

Известно е, че развитието на затлъстяване е съпроводено с нискостепенно хронично възпаление, което засяга различни клетки на мастната тъкан, в т.ч. преадипоцити, адипоцити и макрофаги. Последниците са понижаване на инсулиновата чувствителност, развитието на патологични състояния като диабет тип 2 и метаболитен синдром (Tajiri et al., 2005; Olefsk & Christopher, 2010). Ето защо в настоящия труд бяха изследвани антиоксидантното, противовъзпалително и анти-ER стрес действие на екстракти от плодове на бъзак във връзка с

потенциалното им антидиабетно действие в модели на стимулирани с оксидант 3T3-L1 преадипоцитни и с LPS J774A.1 макрофажни клетъчни линии.

За да се изследва протективното действие на воден екстракт от бязак върху клетъчни култури в условия на оксидативен стрес, бе извършено претретиране на 3T3-L1 преадипоцити с нарастващи концентрации на воден екстракт; последващо индуциране на оксидативен стрес чрез третиране с t-ButOON и анализ на генната експресия на ензими, пряко свързани с клетъчната антиоксидантна защита (GCLc и GPx-4) и ензими и фактори, свързани с контрола и протичането на възпалителен процес (TNF α , iNOS, COX-2).

От по-ранни изследвания е известно, че с увеличаване концентрацията на t-ButOON в културалната среда се увеличава експресията и на двата изследвани гена, свързани с антиоксидантната защита (Киселова, 2011). Като индуктор на оксидативен стрес t-ButOON повишава активността на транскрипционни фактори като NF- κ B (Munroe et al., 1995). Този транскрипционен фактор контролира генната експресия на ензими като GCLc и GPx-4, както и на проинфламаторни цитокини като TNF α (Shakhov et al., 1990; Collart et al., 1990) и ензими като индуцируемата NO синтаза (iNOS) (Geller et al., 1993) и индуцируемата циклооксигеназа (COX-2) (Yamamoto et al., 1995), като по този начин NF- κ B оксидативния стрес и индукцията на тези белтъци.

Използването на модел на t-ButOON индуциран оксидативен стрес при преадипоцитни клетки, бе обосновано и от факта, че подобен стрес в мастна тъкан, индуцирайки впоследствие и възпалителен процес, води до повишена продукция на IL-6, IL-1 β , и TNF α (Scherer, 2006; Wang et al. 2008; Halberg et al., 2008). Известно е, че понижената инсулинова чувствителност е резултат от повишени нива на проинфламаторни цитокини (Tajiri et al., 2005). Горепосочените цитокини се продуцират, както от адипоцити, така и от макрофаги (Scherer, 2006; Wang et al. 2008; Halberg et al., 2008). И двата вида клетки са представени в мастната тъкан и са подходящ обект за изследване ефекта на различни биологично активни вещества с потенциална AOA и противовъзпалително действие. Такива вещества се съдържат в екстрактите от плодове на бязак, анализирани в настоящото изследване.

Влиянието на SEF бе анализирано и в условия на етанол индуцирано възпаление при 3T3-L1 преадипоцитни клетки. Приложеният експериментален модел е представен в раздел „Материали и методи“, точка 4.2.8. Известно е, че в отговор на третиране с етанол се повишават нивата на експресия на провъзпалителните цитокини IL-6 и TNF α , както и на проинфламаторните ензими iNOS и COX-2 при плъхове и мишки (Nanji et al., 1997, Yuan et al., 2006; Fernandez-Lizarbe et al., 2008; Maraslioglu et al., 2014). Много малко са изследванията, които представят влиянието на етанола върху мастната тъкан или пре/адипоцити. Така например, едно изследване върху плъхове *in vivo* потвърждава, че нивата на IL-6, TNF α и MCP-1 се повишават в резултат от инфилтрация на макрофаги в мастна тъкан след хроничен прием на етанол (Kang et al., 2007). По този начин Kang и колектив доказват възникването на инсулинова резистентност в резултат от хронична консумация на EtOH.

Анализът на протективното действие на воден екстракт от плодове на бязак върху клетъчна култура в условия на индуцирано възпаление бе осъществен чрез претретиране на J774A.1 макрофаги с нарастващи концентрации на воден екстракт и последващо индуциране на възпалителен процес с LPS. В така третирани клетки бе анализирана генната експресия на белтъци, пряко свързани с клетъчната антиоксидантна защита (GCLc и GPx-4), с контрола и протичането на възпалителен процес (IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-1RN, MCP-1, ICAM-1, Nox1, aP2, iNOS, COX-2, Sirt-1, NF- κ B), както и вътреклетъчното съдържание на iNOS и свързаните с ER стрес белтъци като ATF6 α , eIF2 α и CHOP.

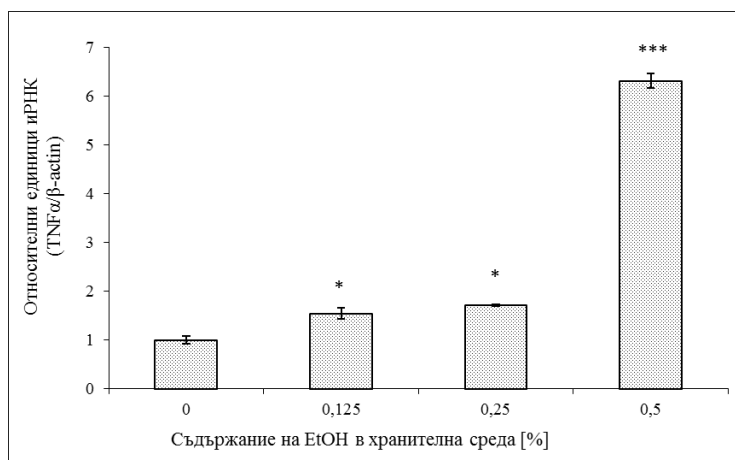
Моделът на LPS индуцирано възпаление при J774A.1 макрофажна клетъчна линия е добре познат и използван при анализ на противовъзпалителното действие на различни агенти, субстанции и биологично активни вещества с растителен произход, сред които галотанини например (Tan et al., 2006; Kim et al., 2009). Третирането с LPS индуцира генната експресия като повишава и цитозолните белтъчни нива на цитокини (IL-1 β и IL-6) и на провъзпалителни ензими (iNOS), чрез активиране на NF- κ B транскрипционният фактор (Pahl, 1999; Tan et al., 2006; Kim et al., 2009; Maraslioglu et al., 2014). Като регулатор на експресията на възпалителни цитокини, хемокини, имунорецептори и клетъчни адхезионни молекули той е посочван сред основните транскрипционни фактори на имунния отговор или по-скоро като основен регулатор на клетъчния отговор при стрес.

Използването на такъв експериментален модел бе провокирано и от факта, че възпалителният процес и особено хроничното нискостепенно възпаление при наднормено тегло, могат да доведат до развитието на инсулинова резистентност, диабет тип 2 и метаболитен синдром, както и съпътстващите ги усложнения като атеросклероза и високо кръвно налягане (Anan et al., 2007, Calder et al., 2011). При затлъстяване в мастната тъкан се продуцира голямо количество проинфламаторни свободни ВМК, адипокини, хемокини (MCP-1) (Maury и Brichard, 2010) и цитокини (TNF α , IL-6) (Olefsky и Christopher, 2010), които усилват инфилтрацията на макрофаги (Nguyen et al., 2007). Активирането на TLR4/NF-kB сигнален път от свободни ВМК при затлъстяване (Solinas et al., 2007; Nguyen et al., 2007) и бактериални ендотоксини (Pahl, 1999) отключва инсулинова резистентност (Maury и Brichard, 2010). Именно възпалението е обединяващото звено между патологични състояния, като затлъстяване, инсулинова резистентност, диабет тип 2 и комплексният метаболитен синдром.

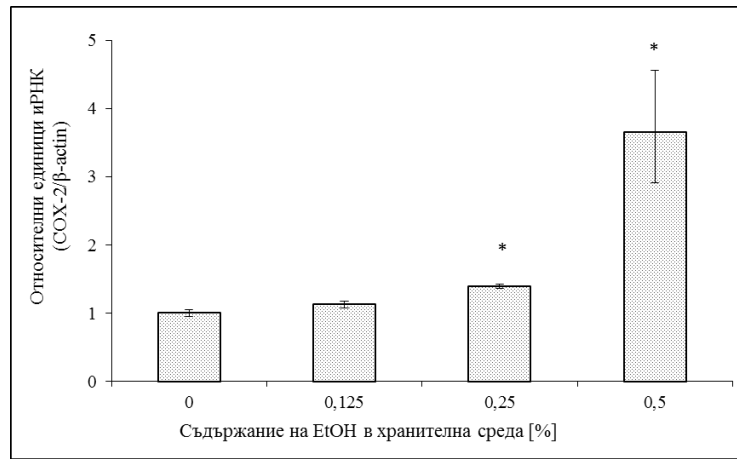
Имайки предвид тези вече известни факти и взаимовръзки, би било логично търсенето на биологично активни вещества, които да облекчат процеса на възпаление и намалят вероятността от развитие на съответните усложнения. Анализирането на противовъзпалителното действие на воден екстракт от плодове на бъзак при модел на LPS индуцирано възпаление в макрофаги, би разкрило потенциала му при превенцията и/или лечението на състояния, свързани с развитието на нискостепенно възпаление, каквито са горепосочените.

4.3.1.1. Ефект на етанола върху нивата на проинфламаторни белтъци

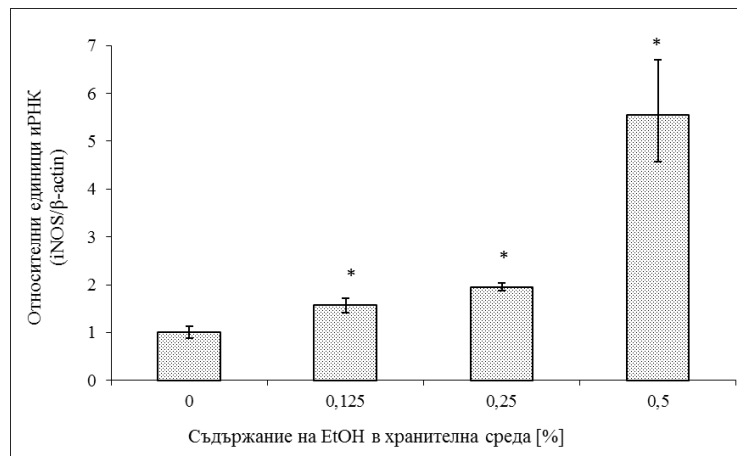
Ефективността на етанола като индуктор на възпаление бе анализиран, като култивирани миши 3T3-L1 преадипоцити бяха третирани с нарастващи концентрации и бяха изследвани транскрипционните нива на възпалителния цитокин TNF α и провъзпалителните ензими COX-2 и iNOS. В експериментални модели с животни вече е доказан провъзпалителният ефект на EtOH (Nanji et al., 1997, Yuan et al., 2006), както и при някои клетъчни линии (Fernandez-Lizarbe et al., 2008), но за използваните от нас преадипоцитни клетки данните са оскъдни.



Фиг. 7 Изменение в генната експресия на TNF α под действие на различни концентрации EtOH при 3T3-L1 преадипоцитни клетки. 0% - контролна група нетретирани клетки. * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$ спрямо контролата. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.



Фиг. 8 Изменение в генната експресия на ензима COX-2 под действие на различни концентрации ЕтОН при 3Т3-L1 преадипоцитни клетки. 0% - контролна група нетретиранни клетки. * $p < 0.05$ спрямо контролата. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.



Фиг. 9 Изменение в генната експресия на ензима iNOS под действие на различни концентрации ЕтОН при 3Т3-L1 преадипоцитни клетки. 0% - контролна група нетретиранни клетки. * $p < 0.05$ спрямо контролата. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.

При третиране на 3Т3-L1 преадипоцитни клетки с нарастващи концентрации на ЕтОН се отчита дозозависима индукция на генната експресия на цитокина TNF α (фиг. 7) и ензимите COX-2 (фиг. 8) и iNOS (фиг. 9). Етанолните концентрации от 0,125% и 0,25% повишиха нивата на TNF α иРНК съответно с 54% ($p=0,015$) и 71% ($p < 0,05$), докато третиране с най-високата концентрация от 0,5% предизвика шесткратно увеличение на същата иРНК ($p < 0,001$). Дозозависимият ефект се потвърждава и от високата корелация между нивата на иРНК на цитокина и приложените етанолни концентрации $r^2=0,93$.

Подобно на генната експресия на TNF α , третирането с етанол стимулира транскрипцията и на провъзпалителните ензими COX-2 (фиг. 8) и iNOS (фиг. 9). С повишаване на етанолната концентрация в хранителната среда бе наблюдавано и постепенно индуциране на транскрипционните нива на iNOS съответно с 57%, 95% и 554% ($p < 0,05$). Транскрипцията на COX-2 след третиране с нарастващи концентрации на етанол също бе повишена. Етанол в концентрации от 0,125%, 0,25% и 0,5% повиши нивата на иРНК за ензима съответно с 13%, 40% ($p < 0,01$) и 365% ($p < 0,05$) в сравнение с нетретираната контролна група. Както и при TNF α нивата на иРНК за двата ензима корелираха с етанолната концентрация ($r^2=0,95$ за iNOS и $r^2=0,93$ за COX-2).

С проведените анализи бе потвърдено, че третирането с етанол на преадипоцити несъмнено потенцира възпаление, индуцирайки генната експресията на провъзпалителни цитокини и ензими като TNF α , iNOS и COX-2. Би могло да се спекулира, че подобен ефект етанолът би имал и върху мастната тъкан.

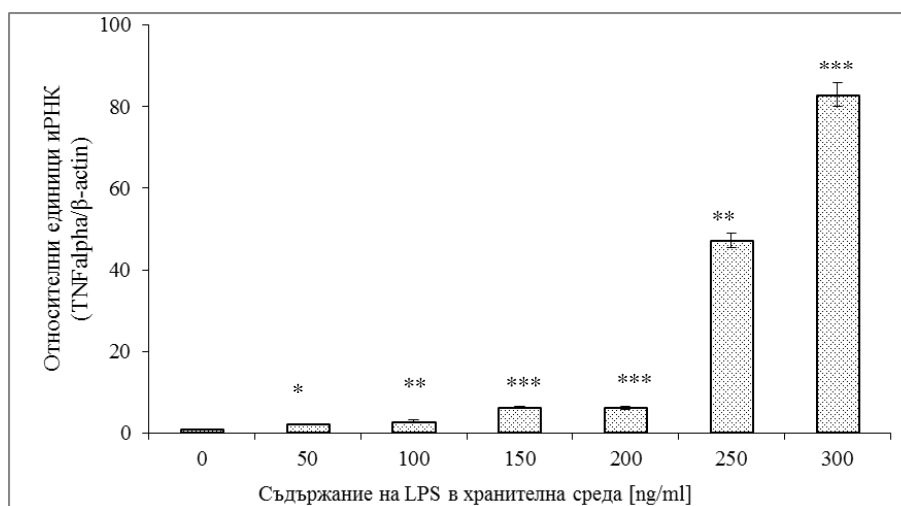
Известно е, че етанолът индуцира проинфламаторните цитокини IL-6 и TNF α и ензими iNOS и COX-2 (Nanji et al., 1997; Yuan et al., 2006). Маснатата тъкан може да бъде важен обект на действие на етанола. Така например при човешка адипоцитна клетъчна линия Wandler и съавтори (2008) доказват повишение в експресията на IL-6 след третиране с етанол. Друго изследване посочва, че при хронична консумация на етанол при плъхове се увеличават нивата на цитокините IL-6 и TNF α в маснатата тъкан (Kang et al., 2007). При хора повишените нива на IL-6 и TNF α в масната тъкан, корелират с етанол-индуцирано увреждане на черният дроб (Naveau et al., 2010).

Изследванията на ефекта на етанола върху експресията на провъзпалителни цитокини и ензими при адипоцити са ограничени. Преадипоцитите заедно със зрелите адипоцити и макрофагите като част от маснатата тъкан секретират различни цитокини и хемокини.

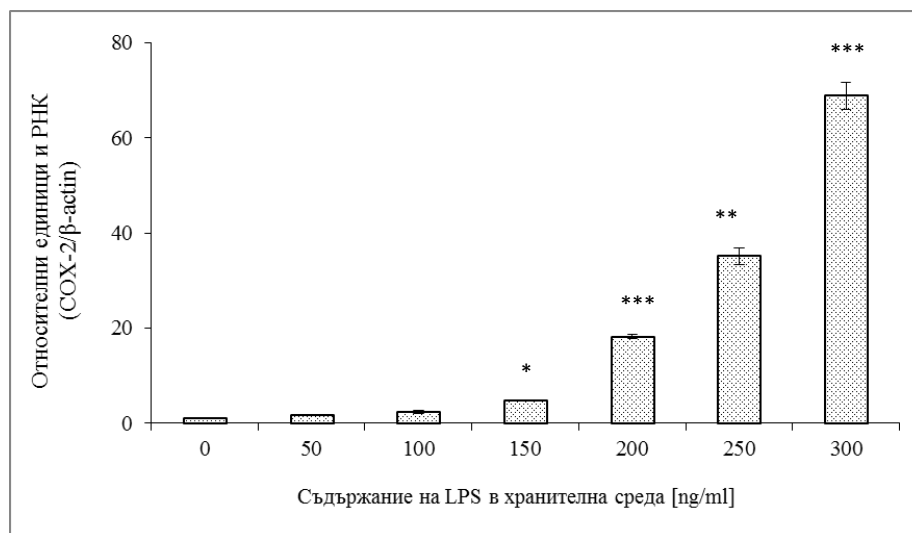
Използването на модел на етанол индуцирано възпаление при преадипоцити за анализиране протективното действие на воден извлек от плодове на *S. ebulus*, би разкрило противовъзпалителното действие и противодиабетен потенциал на билката.

4.3.1.2. Ефект на LPS върху нивата на проинфламаторни белтъци

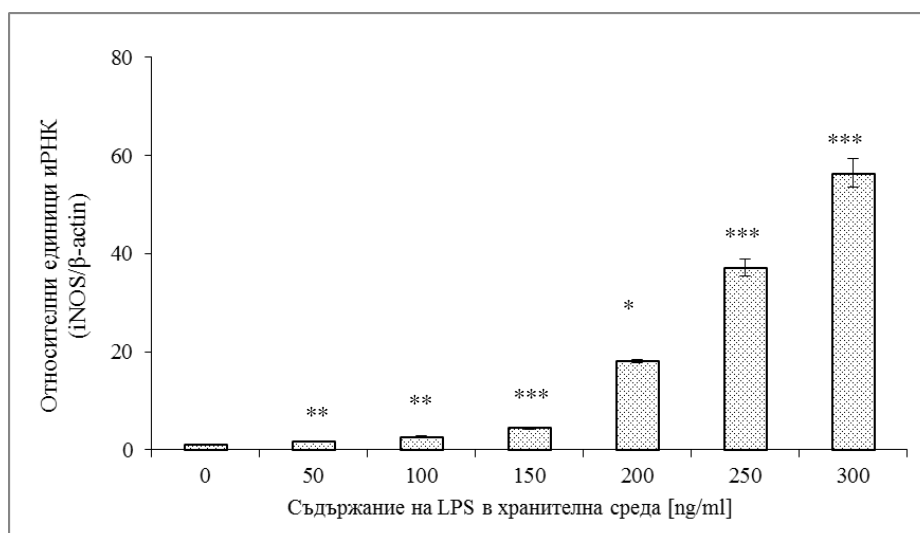
За да проверим степените на индукция на определени провъзпалителни фактори при стимулирани с нарастващи концентрации на LPS J774A.1 макрофаги, бе анализирана генната експресия на цитокина TNF α (фиг. 10) и ензимите COX-2 (фиг. 11) и iNOS (фиг. 12).



Фиг. 10 Изменение в експресията на TNF α под действие на нарастващи концентрации LPS при J774A.1 клетки. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо нетретираната с LPS контролна група. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.



Фиг. 11 Изменение в експресията на COX-2 под действие на нарастващи концентрации LPS при J774A.1 клетки. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо нетретираната с LPS контролна група. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.



Фиг. 12 Изменение в експресията на iNOS под действие на нарастващи концентрации LPS при J774A.1 клетки. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо нетретираната с LPS контролна група. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.

С увеличаване на концентрацията на LPS в културална среда от 50ng/ml до 300ng/ml се забелязва очаквано дозозависимо сигнификантно индуциране на нивата иРНК на всички изследвани провъзпалителни маркери ($p < 0.001$). С увеличаване концентрацията на LPS нивата на TNF α кодиращата иРНК се индуцираха до 82 пъти ($p < 0.001$) в сравнение с нетретираната контролна група макрофаги. Транскрипционните нива на проинфламаторните ензими iNOS и COX-2 се повишиха до 68 и 56 пъти ($p < 0.001$) съответно.

За експериментите, в които бе анализирано противовъзпалителното действие на екстракта от плодове на бъзак в условия на индуцирано възпаление, бе избрана концентрацията от 200ng/ml. При концентрация на LPS от 200ng/ml се постига едно достатъчно отчетливо индуциране на провъзпалителните белтъци, като същата концентрация проявява една приемлива цитотоксичност съгласно MTT теста (фиг. 5) възлизаща на почти 15% ($p < 0.01$).

Макрофажните клетъчни линии са използвани основно в модели на индуцирано възпаление, като LPS са един от основните индуктори, съответно активатори на макрофаги (Tan et al., 2006; Kim et al., 2009). Те са удобни за анализиране на противовъзпалителния ефект на различни екстракти, извлекци и биологично активни вещества от растителен произход (Raso et al., 2001; Vigo et al., 2004). Третирането с нарастващи концентрации на LPS индуцира експресията на про-инфламаторните ензими iNOS и COX-2 и цитокина TNF α . Резултатите от настоящото изследване и тези цитирани по-

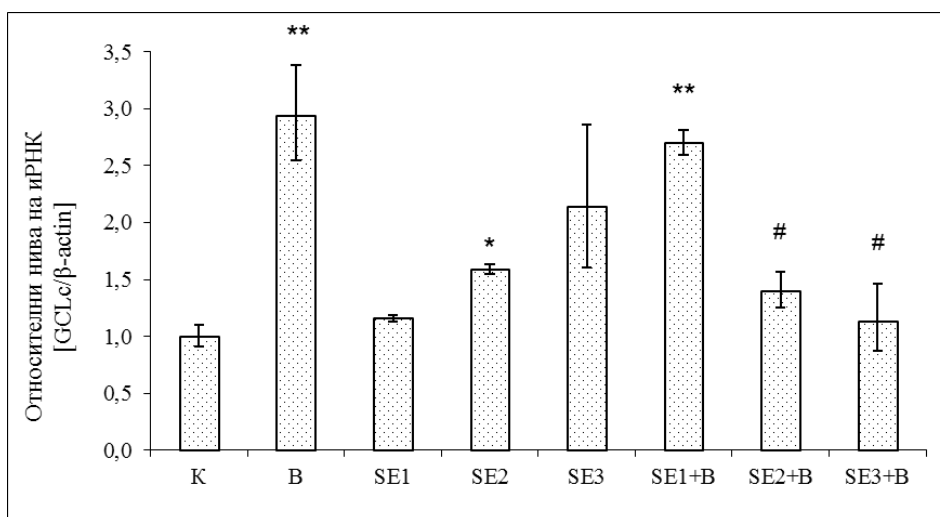
горе потвърждават ефективността и репродуктивността на използвания модел като един от основните при анализа на противовъзпалителната активност на различни биологично активни вещества.

4.3.2. Изследване на антиоксидантното действие на плодове от *Sambucus ebulus* L. при 3T3-L1 преадипоцитна и J774A.1 макрофажна клетъчни линии в условия на индуцирани оксидативен стрес и възпаление

4.3.2.1. Влияние на воден екстракт плодове на *Sambucus ebulus* върху транскрипционните нива на GCLс и GPx-4 при 3T3-L1 преадипоцити в условия на *t-ButOON* индуциран оксидативен стрес

Проучването на действието на екстракта от бъзак върху експресията на редокссензитивни гени, в случая за ензими от синтеза на глутатион в преадипоцитна 3T3-L1 клетъчна линия, показва, че самият екстракт стимулира приблизително два пъти експресията на GCLс, като налице е и дозозависим ефект (фиг. 13).

При концентрация на екстракта от 5% в културална среда се отчита статистически значимо повишение в степента на експресия на гена за GCLс, като при концентрация на екстракта от 10% се достига близо два пъти и половина индукция спрямо контролната група нетретирани клетки.



Фиг. 13 Изменение в експресията на ензима GCLс под действие на различни концентрации воден екстракт от бъзак при оксидативно стимулирани 3T3-L1 преадипоцитни клетки. **К** – контрола нетретирани клетки; **В** – 100μM *t-ButOON*; **SE1** – 2.5%, **SE2** – 5%, **SE3** – 10% съдържание на екстракт от *S. ebulus* в хранителна среда. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ спрямо К; # $p < 0.05$ спрямо В. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.

Прилагането на 100 μM *t-ButOON* води до индуциране на експресията на ензима, при това в значителна ($p < 0.01$) степен (близо три пъти) спрямо групата нетретирани клетки. Претретирание с воден екстракт от *S. ebulus* и последващо прилагане на *t-ButOON* също предизвиква увеличение на нивото на генна експресия на GCLс в сравнение с контролната група. При претретирание с екстракт от бъзак и последващо прилагане на оксидант степента на индукция на ензима е значително ($p < 0.05$) по-ниска спрямо степента на индукция, предизвикана само от оксиданта, което може да се отчете като резултат от протективното, АО действие на екстракта.

Нивата на експресия на ензима GPx-4 в сравнение с тези на ензима GCLс се повлияват по-слабо, както от страна на самият оксидант, така и в случая на претретирание с билковия екстракт и последващо третиране с оксидант. Въпреки този факт, при третирането с *t-ButOON* се отчита статистически значимо повишение (** $p < 0.01$) в нивата на експресия на GPx-4 спрямо контролната група клетки. При претретирание на 3T3-L1 клетки с водния екстракт от плодове на бъзак се забелязва значимо понижение (# $p < 0.05$) в нивата на иРНК за GPx-4 спрямо групата третирана с оксидант.

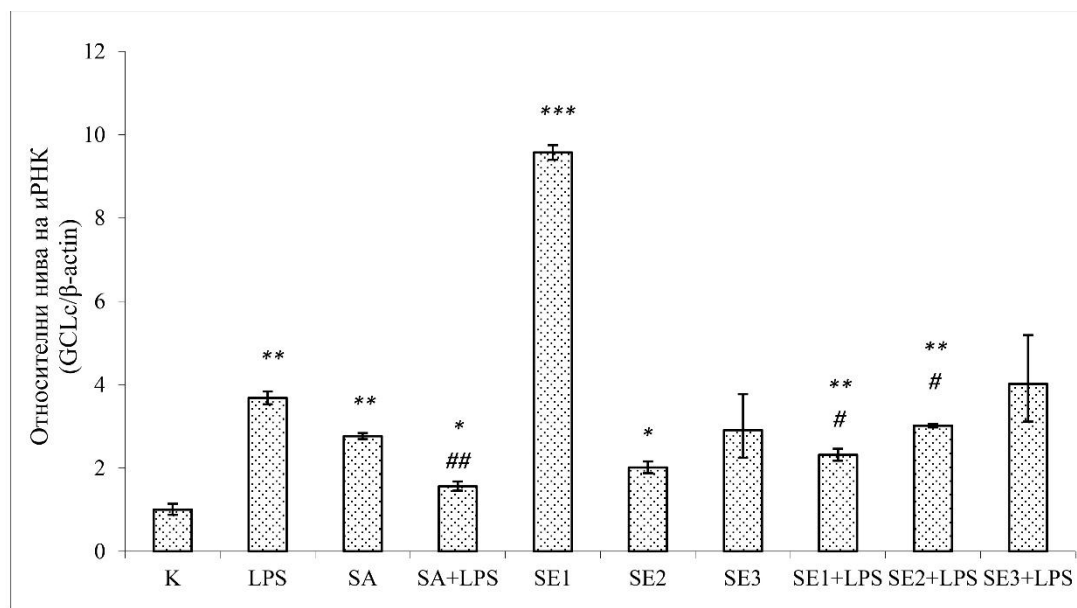
4.3.2.2. Влияние на воден екстракт от плодове на *Sambucus ebulus* върху транскрипционните нива на GCLc и GPx-4 при J774A.1 макрофаги в условия на LPS индуцирано възпаление

За да се анализира ефектът на воден екстракт от плодове на бъзак в условията на индуциран възпалителен процес, J774A.1 макрофаги бяха претретирани съответно с нарастващи концентрации на екстракта или със 100 μ M салицилова киселина (положителна контрола) и последващо третирани или не с 200ng/ml LPS.

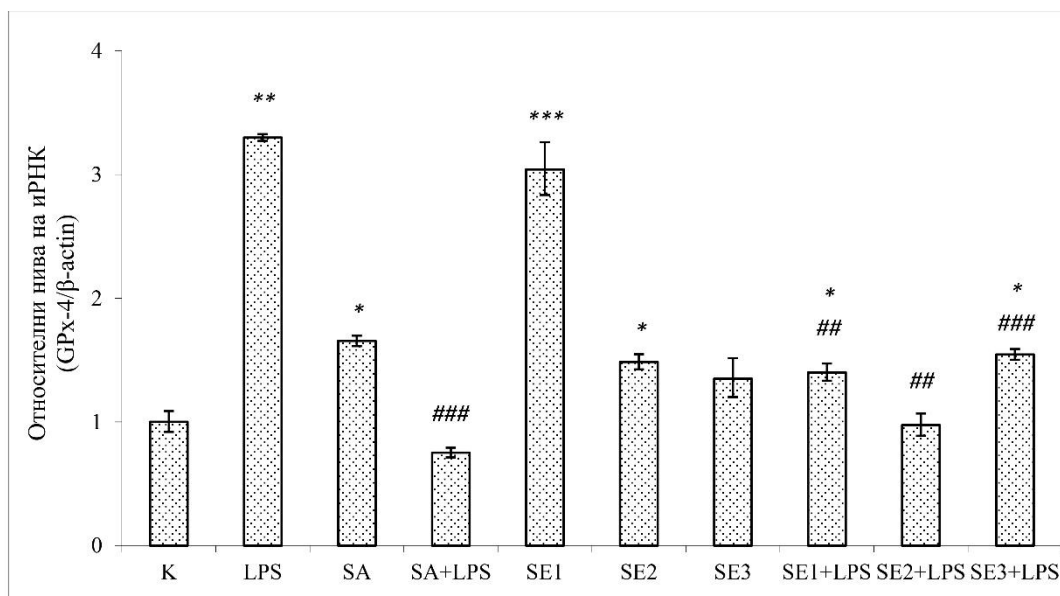
Резултатите от анализа на транскрипционните нива на антиоксидантните ензими GCLc и GPx-4 при LPS стимулирани макрофаги са представени съответно на фигури 14 и 15.

При групите клетки, третирани с индуктора на възпаление, нивата и на двата антиоксидантни ензима се повишават над три пъти. При това индукцията е статистически значима ($p < 0,01$). Интересно е, че ниските концентрации на водния екстракт индуцират най-силно транскрипцията и на двата ензима (GCLc и GPx-4) съответно с 9,5 и 3 пъти ($p < 0,001$). Подобен, но много по-слаб бе ефектът на позитивната контрола салицилова киселина.

При групите клетки, претретирани с нарастващи концентрации на екстракт от бъзак в условия на индуцирано възпаление транскрипционните нива и на двата ензима бяха значително по-ниски в сравнение с LPS третираната контролна група (фиг. 14 и 15). Подобно на салициловата киселина, ниската концентрация на екстракта от бъзак значително понижи LPS индуцираната генна експресия съответно за GCLc с 37% ($p < 0,05$) и GPx-4 с 57% ($p < 0,01$). По-високите концентрации на екстракта понижиха по-слабо експресията на GCLc, докато транскрипционните нива за GPx-4 се понижиха значително ($p < 0,01$) и при по-високите концентрации.



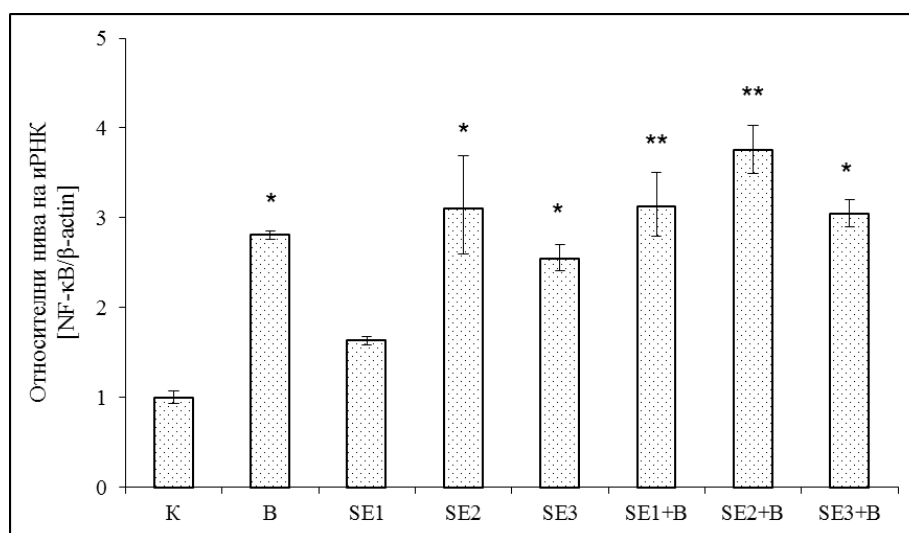
Фиг. 14 Изменение в експресията на ензима GCLc под действие на нарастващи концентрации екстракт от *S. ebulus* в условия на LPS индуцирано възпалителение при J774A.1 макрофаги. **K** – контрола нетретирани клетки; **LPS** – 200ng/ml липополизахариди; **SA** – 100 μ M СК; **SE1** – 2.5%, **SE2** – 5%, **SE3** – 10% екстракт от *S. ebulus* в хранителна среда. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо K; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, спрямо LPS. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.



Фиг. 15 Изменение в експресията на ензима GPx-4 под действие на нарастващи концентрации екстракт от *S. ebulus* в условия на LPS индуцирано възпалително при J774A.1 макрофаги. **К** – контрола нетретираните клетки; **LPS** – 200ng/ml липополизахариди; **SA** – 100μM СК; **SE1** – 2.5%, **SE2** – 5%, **SE3** – 10% екстракт от *S. ebulus* в хранителна среда. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо **К**; ## $p < 0.01$ спрямо **LPS**. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.

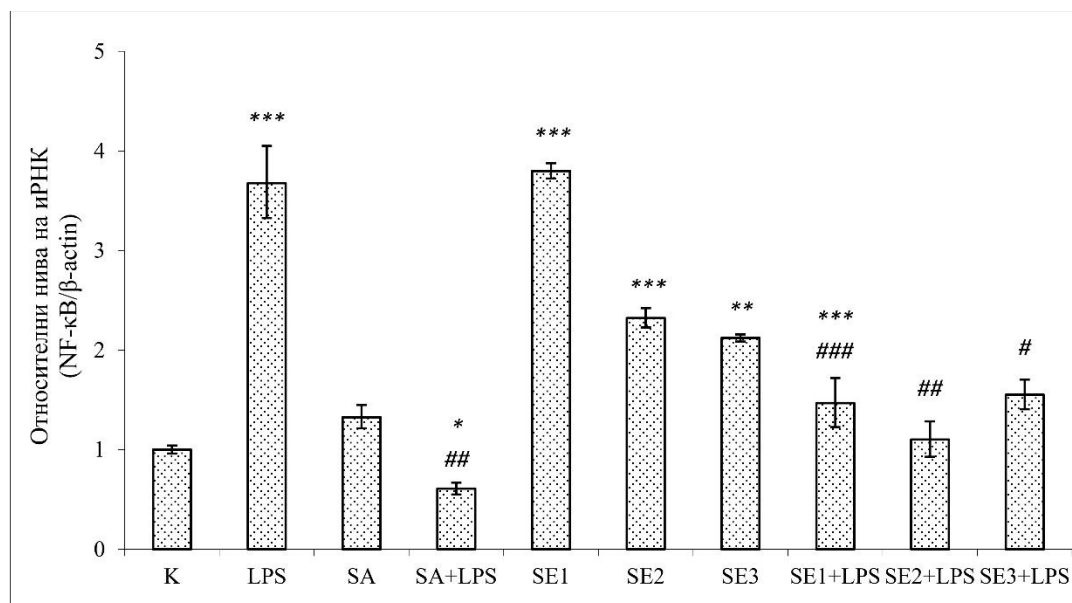
4.3.2.3. Влияние на воден екстракт от плодове на *Sambucus ebulus* върху транскрипционните нива на NF-κB при 3T3-L1 преадипоцити и J774A.1 макрофаги, съответно в условия на индуциран оксидативен стрес и възпаление

Резултатите от анализа на генната експресия показаха индуциране на транскрипционните нива на NF-κB от страна на t-ButOОН и LPS (фиг. 16 и 17). Предвид факта, че NF-κB е един от основните транскрипционни фактори, участващи в регулацията на отговора при стресови състояния (Pahl, 1999, Surh and Na et al., 2008), получените резултати за LPS третираните групи бяха очаквани.



Фиг. 16 Изменение в експресията на ензима NF-κB под действие на различни концентрации воден екстракт от бъзак при оксидативно стимулирани 3T3-L1 преадипоцитни клетки. **К** – контрола нетретираните клетки; **B** – 100μM t-ButOОН; **SE1** – 2.5%, **SE2** – 5%, **SE3** – 10% съдържание на екстракт от *S. ebulus* в хранителна среда. * $p < 0.05$. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.

Третирането с оксидант индуцира близо 3 пъти ($p < 0.05$) генната експресия на NF-κB (фиг. 16). Нарастващи концентрации на екстракта сами по себе си също индуцират експресията на транскрипционния фактор, при това значително ($p < 0.01$). Съществена разлика в транскрипционните нива между третираните с оксидант клетки и тези, претретираните с различни концентрации на екстракта, не бе отчетена. Вероятно големите отклонения от средната стойност при последните три групи не позволиха отбелязване на статистически значими изменения в сравнение с t-ButOОН третираната контролна група.



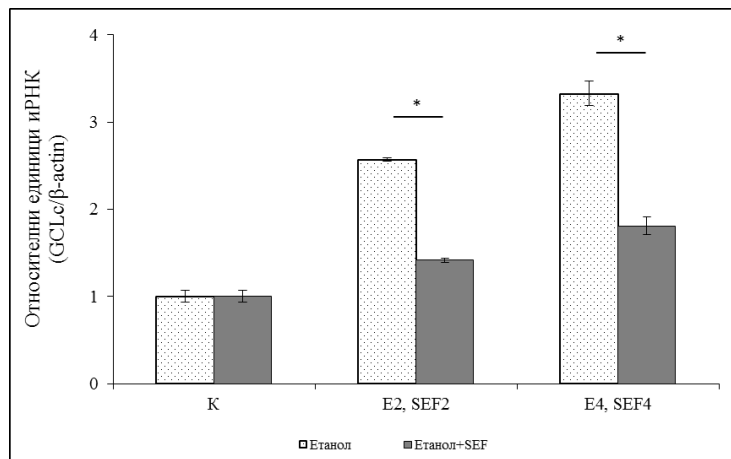
Фиг. 17 Изменение в експресията на белтъка NF-κB под действие на нарастващи концентрации екстракт от *S. ebulus* в условия на LPS индуцирано възпалителение при J774A.1 клетки. **K** – контрола нетретираните клетки; **LPS** – 200ng/ml липополизахариди; **SA** – 100μM салицилова к-на; **SE1** – 2.5%, **SE2** – 5%, **SE3** – 10% екстракт от *S. ebulus* в хранителна среда. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ спрямо LPS. Представени са средните стойности за всяка една група ± SEM.

В модела на индуцирано възпаление LPS стимулират близо четирикратно ($p < 0.001$) генната експресия на NF-κB (фиг. 17). Бидейки един от основните LPS активирани транскрипционни фактори при макрофаги, логично е нивата на NF-κB да се повишават. Позитивната контрола салицилова киселина сама по себе си не оказва влияние върху транскрипционните нива на NF-κB, докато при LPS стимулираните макрофаги ги понижава до нормални ($p < 0.01$). Подобен ефект имат и нарастващи концентрации на екстракта. Те потискат LPS стимулираната транскрипция на гена за NF-κB напълно ($p < 0.01$).

4.3.2.4. Влияние на SEF върху транскрипционните нива на GCLc при 3T3-L1 преадипоцити в условия на етанол индуцирано възпаление

За да анализираме протективното действие на SEF в условията на етанол индуциран възпалителен процес, 3T3-L1 преадипоцити бяха котретираните с етанол и разтворената в него етилацетатна фракция от плодове на бъзак, като контролни групи клетки бяха третираните само с етанол. Редом с транскрипционните нива на провъзпалителни цитокини бяха анализирани и тези на ензима от вътреклетъчната антиоксидантна защита GCLc (фиг. 18).

Нарастващи концентрации на етанол сами по себе си индуцираха до над 3 пъти генната експресия на ензима GCLc ($p < 0.01$). В групите котретираните с SEF и етанол нивата на транскрипция бяха значително ($p < 0.05$) понижени в сравнение с контролните етанолни третиранения. Концентрациите от 0,01% и 0,02 SEF в хранителна среда понижиха етанол индуцираната експресия със съответно 44% ($p < 0.05$) и 45% ($p < 0.05$).



Фиг. 18 Изменение в генната експресия на ензима GCLc под действие на различни концентрации SEF в условия на EtOH индуцирано възпаление при 3T3-L1 преадипоцитни клетки. **К**-контролна група нетретиранни клетки; **E2**-0.25%, **E4**-0.5% концентрация на EtOH в хранителна среда; **SEF2**-0.01%, **SEF4**-0.02% w/v съдържание на етилацетатна фракция от плодове на бъзак в хранителна среда. * $p < 0.05$ разлика между групите етанол и етанол + SEF. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.

Обсъждане

Концентрация от 100 μ M t-ButOОН стимулира експресията на GCLc до три пъти, докато експресията на GPx-4 бе повлияна по-слабо спрямо контролата от нетретиранни клетки. При по-ранни изследвания (Киселова, 2011) е установено, че с увеличаване концентрацията на t-ButOОН в културалната среда се увеличава експресията и на двата изследвани гена.

Стимулиране на транскрипцията на GCL като регулаторен ензим от синтеза на GSH се потвърждава и от други автори. През 2009 година Kobayashi и съавтори също установяват увеличени нива на иРНК на ензима GCL след третиране с H₂O₂ на 3T3-L1 преадипоцитни клетки. Под действието на оксидативния агент t-ButOОН се индуцира оксидативен стрес, в резултат на което в клетката се стимулира вътреклетъчната АО защита. Тези резултати и факти подкрепят и наблюдаваното при настоящото изследване повишаване в експресията на ензима GCLc при третиране с оксиданта преадипоцитни клетки (фиг. 13).

В условия на активиран имунен отговор се активира процес на респираторен взрив, при който се продуцира голямо количество АКФ, което предизвиква активиране на клетъчните антиоксидантни системи. При третираните с LPS макрофаги индуцираният имунен отговор е свързан и с индуциране на клетъчните антиоксидантни механизми. И двата ензима (фиг. 14 и 15) от глутатионовата АО система се индуцират над три пъти. По подобен механизъм и в отговор на етанол индуцираното възпаление GCLc транскрипционните нива също се индуцират (фиг. 18).

Логично е наблюдаването на повишение в нивата на ензими от синтеза и обмяната на глутатион при наличие на свободни радикали в средата. В присъствие на t-ButOОН и при възпалителен процес образуването на АКФ се увеличава. При увеличена концентрация на пероксиди очакваният клетъчен отговор ще бъде стимулиране процесите и пътищата, чрез които те ще се елиминират, т.е. увеличена експресия на GPx-4 и глутатион редуктаза например. Активирането на процеса на обезвреждане на пероксидите с участието на ензима GPx-4 ще консумира GSH, в резултат на което концентрацията му ще намалее. В отговор на това се очаква да бъдат задействани регулаторните системи за възстановяване на GSH/GSSG баланса в полза на редуцирания, в резултат на което се стимулира експресията на регулаторният ензим в синтеза на глутатион, а именно GCLc.

Експресията на GPx-4 е по слабо повлияна при третирането с t-ButOОН, в сравнение с тази на GCL. Това може да се обясни с факта, че времето на третиране и използваната концентрация на оксиданта не изискват значително повишение в нивата на този ензим, тъй като самият ензим остава непроменен в края на катализираната от него реакция. Имайки предвид този факт, може да се допусне, че нивата на наличния ензим вероятно са достатъчни при създадите се условия.

За разлика от преадипоцитите, при макрофагите, нивата и на двата ензима се индуцират значително ($p < 0.01$). Явно нивата на оксидативен стрес са много по-високи в резултат от индуцираното възпаление, което вероятно изисква в по-голяма степен активиране на

антиоксидантните ензими. При RAW 264.7 макрофаги, например, третирането с LPS индуцира продукцията на NO (Ho et al., 2014). Активирането на iNOS при респираторен взрив е свързано с продукцията на пероксинитрити ONOO⁻ (Zhu et al., 2012; Mungrue et al., 2002). NO, чиято продукция се индуцира при респираторен взрив в макрофаги, лесно реагира със супероксиден радикал, което води до образуването на пероксинитрити. Това засилва оксидативния стрес в клетките и вероятността от апоптоза и обяснява активирането на вътреклетъчната АО защита.

При хора, консумиращи алкохол във високи дози (Girre et al. 1994), а и тези консумирали по-малки количества (Liangpunsakul et al. 2005), са установени завишени нива на ензима цитохром P450 2E1. Високата НАДФ.Н оксидазна активност на ензима води до продукцията на голямо количество супероксиден радикал и H₂O₂. Нивата на ензима силно корелират с НАДФ.Н оксидазната му активност и липидната пероксидация, както в черен дроб на хора, така и при гризачи, подложени на високо алкохолна диета (Ronis et al. 1996). Ефективното окисление на НАДФ.Н от цитохром P450 2E1 е причина за продукцията на голямо количество супероксиден радикал и H₂O₂, които са сред основните фактори за алкохол индуцирания оксидативен стрес. От 1963г. още е известно, че оксидативният стрес е в основата на токсичното действие на етанола (Di Luzio, 1963). Множество изследвания показват, че етанолът активира образуването на различни свободни радикали като 1-хидроксиетилрадикал, NO, липидни пероксиди при различни видове клетки (хепатоцити, купферови клетки, ендотелни клетки и лимфоцити (Nordmann et al., 1992; Albano, 2002). При използването на ентерални алкохолни модели (Rouach et al. 1997; Polavarapu et al. 1998) е демонстрирано, че активностите на АО ензими супероксид дисмутаза, каталаза и GPx са в обратна корелация с количеството на етанол индуцираните АКФ. Подобна обратна корелация се наблюдава и по отношение на липидните пероксиди и чернодробни увреждания (Polavarapu et al., 1998). Интересно, обаче нивата на иРНК за чернодробна GPx се индуцират при етанол индуцирана продукция на АКФ (Nanji et al. 1995), което говори за това, че етанолът потиска активността ѝ на пост-транскрипционно ниво. Както се забелязва и на графиката от фигура 18, транскрипционните нива на GCLс се увеличават в отговор на повишените етанолни концентрации при 3T3-L1 преадипоцити.

Направените дотук разсъждения са в подкрепа на вероятния ефект, който етанолна консумация би имала върху клетките на мастна тъкан, а именно индуциране на оксидативен стрес, липидна пероксидация, активиране на нискостепенно възпаление, в резултат от активиране на редокс-сензитивни транскрипционни фактори като NF-κB. Биологично активни вещества като полифенолите със способност да предотвратят един подобен ефект биха били ефективни терапевтици при състояния, свързани с развитието на оксидативен стрес и възпаление.

Действието на GPx-4 за обезвреждане на пероксиди е свързано с директна консумация на GSH, поради което се задействат механизми, отговорни за възстановяването на редокс-баланса GSH/GSSG в клетката, както и тези за *de novo* синтезата на GSH в която играят основна роля ензимите GCL и GSH синтетеза (GSS), като първият от двата се явява регулаторен за метаболитния път.

При изследвания, анализиращи транскрипцията на гена за GCL *in vitro* и *in vivo*, е установено, че множество фенолни съединения могат да увеличат нивото на този ензим като повлияват експресията на гена. Така например растителен екстракт, богат на флавоноиди, в частност кверцетин, активира промотора на гена в COS-1 и HepG2 клетки, което води до увеличено ниво на GSH (Myhrstad et al., 2002). Други изследвания също установяват, че екстракт от плодове, богат на полифеноли и елагова киселина, може да индуцира транскрипцията на GCLh при мишки (Carlsen et al., 2003). Вероятно е високото съдържание на съединения с полифенолна природа в състава на екстракт от плодове на *Sambucus ebulus* да е причина за индукцията на ензимната експресия, наблюдавана при третиране на 3T3-L1 преадипоцитни и J774A.1 макрофажни клетки с него.

При анализиране на измененията в генната експресия на ензима GPx-4 в сравнение с експресията на GCLс се забелязва че първият ензим се индуцира по-слабо под действието на билковия екстракт при преадипоцити. Както бе споменато и преди, този факт може да се обясни с това, че времето на третиране и използваната концентрация на оксиданта най-вероятно не изискват значително повишение в нивата на този ензим, тъй като самият ензим в края на реакцията, остава непроменен. Имайки предвид това, можем да допуснем, че съответните нива на ензима са достатъчни при създадените се условия. Въпреки тези твърдения, лекото, но осезаемо повишение в степента на експресия на GPX-4 под действие на екстракта свидетелства за АОА и конкретно за способността му да индуцира експресията на ензими от клетъчната АО защита.

Различията в експресията на GCLc и GPx-4 между клетките, третирани с екстракт и тези, третирани с екстракт и оксидант, биха могли да бъдат обяснени с доказаните *in vitro* антиоксидантни свойства на екстракта. Наличните в него полифеноли, сред които не малък процент антоцианини, имат способността да свързват и обезвреждат свободни радикали. Така до известна степен те компенсират необходимостта от такова индуциране на антиоксидантна защита, каквото се наблюдава при действие само на оксиданта t-ButOОН.

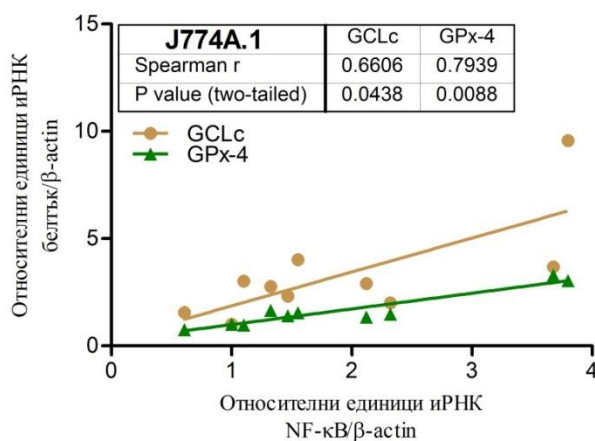
Водният екстракт повлиява положително генната експресия и на двата ензима при макрофаги, при това статистически значимо ($p < 0.001$) (фиг. 14 и 15). Вероятно съдържащите се в екстракта активни вещества (полифеноли) активират редокс-сензитивни транскрипционни фактори като Nrf2 и NF-κB индуцират експресията на клетъчните антиоксидантни ензими и по този начин проявяват протективното си и имуномодулиращо действие.

При претретиране с екстракт от бъзак и последващо прилагане на оксидативен агент или индуктор на възпаление се установява протективно, АО действие на екстракта. То вероятно се изразява в допълнителното участие на наличните в него антиоксиданти в реакции на обезвреждане на самия t-ButOОН и/или на генерираните АКФ в клетките. Намалването на тяхната концентрация води до понижаване и на стимулиращия им ефект върху АО защитни механизми на клетката, част от които е GSH.

Генната експресия на NF-κB се индуцира очаквано при стимулирани с LPS макрофаги, като същият ефект бе наблюдаван и при t-ButOОН стимулирани преадипоцити, което вероятно лежи в основата на индуцираните транскрипционни нива на GCLc и GPx-4. Продукцията на свободни радикали и при двата модела променя редокс баланса и повишава оксидативния капацитет в клетките. Известно е че Nrf2 редокс-сензитивният транскрипционен фактори се активира при тези условия. По този механизъм индуктори на оксидативен стрес и възпаление могат да индуцират експресията на гени като GCLc и GPx-4.

Транскрипцията на гена, кодиращ каталитичната субединица на GCLc, се контролира от регион, съдържащ няколко “response”-елемента, места за свързване на AP-1, NF-κB и някои антиоксидант зависими елементи/електрофилни зависими елементи (AREs/EpREs) (Mulcahy et al., 1997; Myhrstad et al., 2002). Доказано е, че флавоноиди, като кверцетин например, активират синтеза на GSH чрез антиоксидант зависими елементи в промотора на гена за GCL (Myhrstad et al., 2002). Освен това в плодовете на бъзак е доказано наличието на кверцетин и негови производни (Anton et al., 2013; Yesilada et al., 2014). Тези факти подкрепят корелацията между увеличените транскрипционни нива на GCLc и NF-κB, която се забелязва и при двата вида клетки.

Вероятно по-ниските нива на експресия на GCLc при клетки, третирани с екстракт и последващо с оксидант или LPS, се дължат именно на предварително активираните от екстракта редокс-сензитивни транскрипционни фактори. В резултат от активирането на NF-κB нивата на глутатион в клетките и съответно редокс-потенциалът им се увеличават, което се потвърждава и от корелационния анализ (фиг 19). Peng и съавтори (2010) представят резултати, потвърждаващи зависимостта между повишените транскрипционни нива на GCLc и активирането на NF-κB сигналния път. По този начин при последващо активиране на радикалова продукция клетката лесно и бързо може да се справи с възникналия оксидативният стрес.



Фиг. 19 Зависимост между генната експресия на NF-κB и GCLc и GPx-4 при макрофаги.

Явно по подобен механизъм и разтворът на етилацетатната фракция (SEF) предпазва преадипоцитните клетки, подложени на етанол индуцирани оксидативен стрес и възпаление. При котретираните групи клетки експресията на GCLc е значително ($p < 0.05$) по-ниска в сравнение с тази при контролните етанолни групи (фиг. 18).

Според изследвания, които анализират хемопревантивното действие на някои растителни полифеноли като епигалокатехин галат от зеления чай или фитоалексина резвератрол в гроздето и червеното вино в модели на клетъчни култури, те доказано усилват антиоксидантната им защита. В основата на този ефект е активирането на Nrf2 сигналният път (Chen et al., 2005; We et al., 2006; Shen et al., 2005). Същите антиоксиданти проявяват и противовъзпалителен ефект, потискайки активирането на NF- κ B и AP-1, като така инхибират индукцията на COX-2 (Kundu et al., 2006, 2003). Това дава друг поглед върху резултатите, представящи транскрипционните нива на NF- κ B. Може би екстрактът освен, че активира синтеза на GSH, то в условия на индуцирано възпаление инхибира пряко транскрипцията и съответно нивата на NF- κ B. Подобно твърдение дава предпоставка това да бъде анализирано и в настоящият дисертационен труд, като обяснение за потенциалното противовъзпалителното действие на екстракта.

Подобно на GCLc, GPx-4 също е ензим от втората фаза на метаболизма на ксенобиотици, чиято експресия се повлиява положително от активирането на Nrf2 транскрипционният фактор (Thimmulappa R. K. et al., 2002; Salazar M. et al., 2006).

Транскрипционните фактори Nrf1 и Nrf2 също контактуват с AREs/EpREs елементи. Nrf2 е неактивен, когато е свързан към Keap1 белтъка, който го инхибира. Keap1 е белтък, съдържащ тиолни групи, чувствителни на измененията в редокс потенциала на клетката. Свързването на Nrf2 към Keap1 се определя от редуцираното състояние на тези групи (Itoh et al., 1999). При окислението на SH-групите от цистеинови остатъци на Nrf2 афинитетът му към Keap1 белтъка намалява, в резултат на което се освобождава и навлиза в ядрото. Там може да се свързва с малки Maf протеини, с които образува хетеродимери и се свързва към AREs/ EpREs, какъвто има и в промоторния/енхансерния участък на гените за GCL (Myhrstad et al., 2002; Surh and Na, 2002).

Когато действат като антиоксидант, фенолните съединения като кверцетин се окисляват до хинон (Moskaug et al., 2005). Boots и съавтори (2003) изказват твърдение, че някои хинони реагират с тиоли, поради което може да се предположи, че окисленият от радикали кверцетин взаимодейства с тиоли в Keap1 белтъка, който се явява ключов за регулацията на транскрипцията на гени, притежаващи AREs/EpREs, такива като гена за GCL (Moskaug et al., 2005). Това може да се окаже един важен път, по който флавоноидите регулират клетъчните защитни механизми. Всички ензими, участващи в метаболизма на глутатион, би следвало да функционират по един интегриран механизъм, за да има възможност клетката да реагира адекватно в условията на оксидативен стрес.

Според получените резултати следва, че водният екстракт от плодове на бязак има потенциала да модулира клетъчните антиоксидатни системи като стимулира ключови ензими от глутатионовият метаболизъм. Съдържащите се в екстракта полифенолни съединения с пряка АОА и повлияването на транскрипционни фактори като NF- κ B, от друга страна, вероятно са в основата на неговото действие. Имайки предвид факта, че свободните радикали имат роля в развитието на различни форми на инсулинова резистентност (Houstis et al., 2006), то екстракти, подобни на изследвания от нас, биха били приложими за превенцията и терапията на състояния като диабет и метаболитен синдром.

4.3.3. Изследване на противовъзпалителното действие на плодове от Sambucus ebulus като основа за потенциалното им противодиабетно действие при 3T3-L1 преадипоцитна и J774A.1 макрофажна клетъчни линии в условия на индуцирани оксидативен стрес и възпаление

При изследването на протективното действие на воден екстракт от плодове на бязак в условията на t-ButOОН индуциран оксидативен стрес при преадипоцити бяха измерени транскрипционните нива и на провъзпалителните фактори цитокин TNF α , ензимите COX-2 и iNOS, както и на транскрипционния фактор NF- κ B.

При анализа на противовъзпалителното действие на воден екстракт от бязак в условия на LPS индуцирано възпаление при J774A.1 макрофаги бяха анализирани транскрипционните нива на белтъци, пряко свързани с контрола и протичането на възпалителен процес (IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-

1RN, MCP-1, ICAM-1, Nox1, aP2, COX-2, iNOS, Sirt-1), както и вътреклетъчното съдържание на iNOS и свързаните с развитието на ER стрес белтъци ATF6 α , eIF2 α и CHOP.

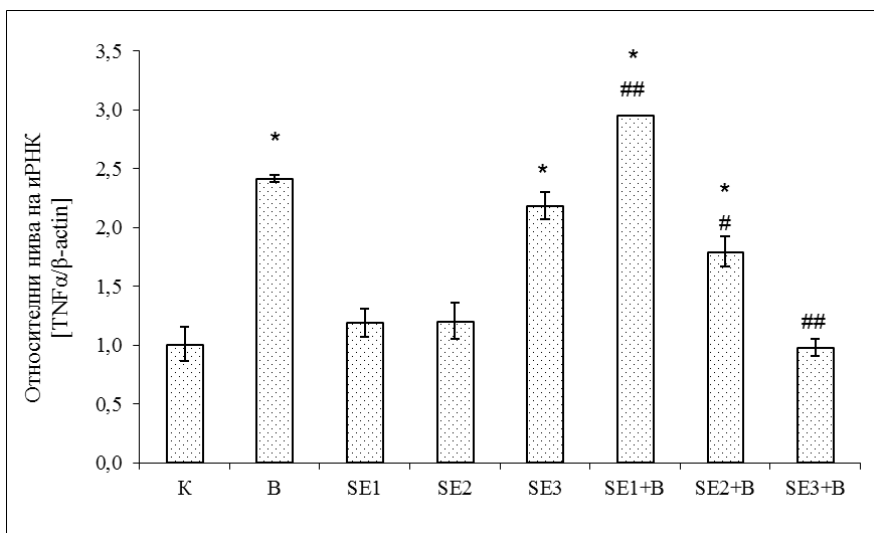
За оценка на противовъзпалителното действие на SEF в условията на етанол индуцирано възпаление, при преадипоцити бе анализирана генната експресия на провъзпалителните цитокини TNF α и IL-6 и ензимите iNOS и COX-2.

4.3.3.1. Влияние върху транскрипционните нива на TNF α

В условия на индуциран оксидативен стрес нивата на TNF α се индуцират до 2,5 пъти ($p < 0,05$) (фиг. 20). Концентрацията от 10% екстракт в хранителна среда индуцира също експресията на цитокина почти толкова, колкото и самият оксидант ($p < 0,05$). Интересното е, че претретирането с екстракт при индуциран оксидативен стрес предпазва клетките от индуциране на възпаление. Наблюдава се дозозависимо значимо ($p < 0,01$) понижение на оксидант индуцираните транскрипционни нива на цитокина.

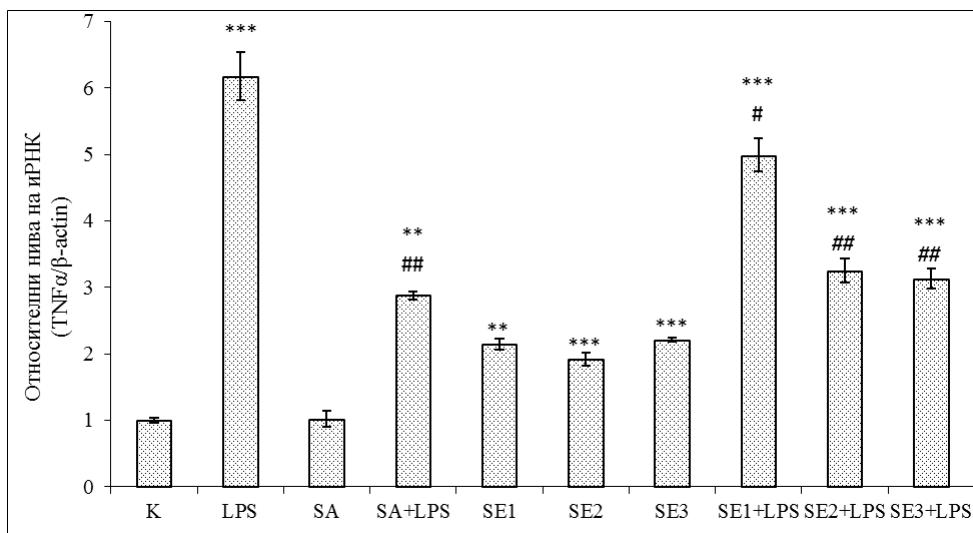
Разликата в експресията на TNF α при макрофаги като клетки на имунния отговор са отчетливи между отделните групи (фиг. 21). Очаквано LPS стимулират шесткратно индуциране експресията на цитокина ($p < 0,001$). Екстрактът сам по себе си също индуцира експресията на белтъка близо два пъти ($p < 0,001$). В условия на възпаление клетките претретираните с екстракт значително понижават ($p < 0,01$) транскрипцията на белтъка в сравнение с третираните само с индуктор, като този ефект е подобен на ефекта на салициловата киселина.

При преадипоцитите котретираните с етил ацетатна фракция и етанол нивата на TNF α се понижават значително в сравнение с етанол третираната група (фиг. 22).

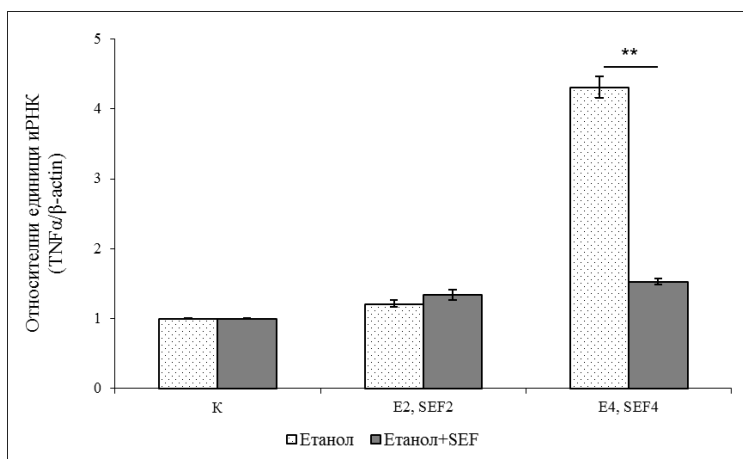


Фиг. 20 Изменение в експресията на ензима TNF α под действие на различни концентрации воден екстракт от бъзак при оксидативно стимулирани 3T3-L1 преадипоцитни клетки. **К** – контрола нетретираните клетки; **В** – 100 μ M t-ButOОН; **SE1** – 2.5%, **SE2** – 5%, **SE3** – 10% съдържание на екстракт от *S. ebulus* в хранителна среда. * $p < 0,05$ спрямо К; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ спрямо В.

Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.



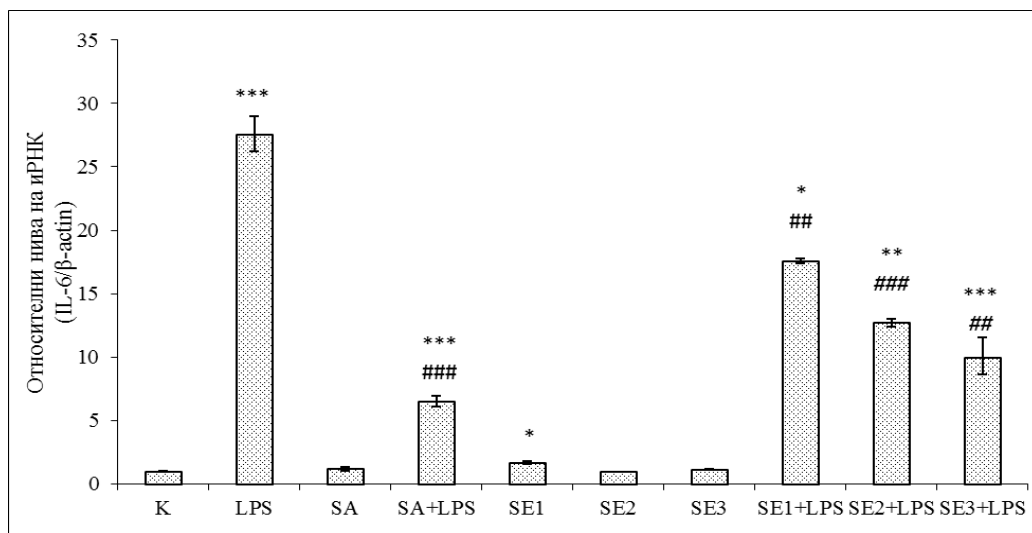
Фиг. 21 Изменение в експресията на белтъка TNF α под действие на нарастващи концентрации воден екстракт от *S. ebulus* в условия на LPS индуцирано възпаление при J774A.1 макрофаги. **К** – контрола нетретираните клетки; **LPS** – 200ng/ml липополизахариди; **SA** – 100 μ M СК; **SE1** – 2.5%, **SE2** – 5%, **SE3** – 10% екстракт от *S. ebulus* в хранителна среда. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо **К**; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ спрямо **LPS**. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.



Фиг. 22 Изменение в генната експресия на TNF α под действие на различни концентрации SEF в условия на EtOH индуцирано възпаление при 3T3-L1 преадипцитни клетки. **К**-контролна група нетретираните клетки; **E2**-0.25%, **E4**-0.5% концентрация на EtOH в хранителна среда; **SEF2**-0.01%, **SEF4**-0.02% w/v съдържание на етилацетатна фракция от плодове на бъзак в хранителна среда. ** $p < 0.01$ разлика между групите етанол и етанол + SEF. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.

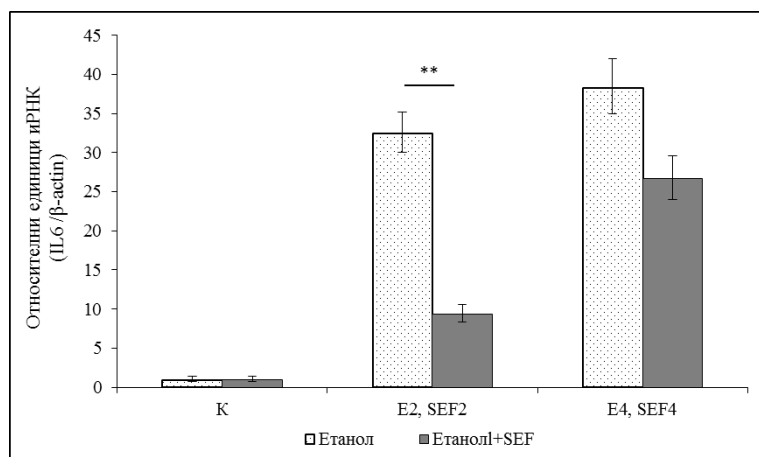
4.3.3.2. Влияние върху транскрипционните нива на IL-6

IL-6 е сред цитокините от острата фаза на възпаление и се индуцират (~27 пъти) значимо при LPS стимулираната група макрофаги ($p < 0,001$) (фиг. 23). Само ниската концентрация от 2,5% воден екстракт в хранителна среда индуцира слабо експресията на цитокина. За разлика от стимулираните с индуктор на възпаление макрофаги, при тези, претретираните с екстракт и в последствие стимулирани, се забелязва дозозависимо понижаване (трикратно) в нивата на цитокина.



Фиг. 23 Изменение в експресията на белтъка IL-6 под действие на нарастващи концентрации воден екстракт от *S. ebulus* в условия на LPS индуцирано възпаление при J774A.1 макрофаги. **К** – контрола нетретирани клетки; **LPS** – 200ng/ml липополизахариди; **SA** – 100μM СК; **SE1** – 2.5%, **SE2** – 5%, **SE3** – 10% екстракт от *S. ebulus* в хранителна среда. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо **К**; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ спрямо **LPS**. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.

При модела с етанол индуцирано възпаление при преадипцити (фиг. 24), индуцираната от етанола експресия на IL-6 се понижава близо три пъти ($p < 0,01$) под действие на 0.01% SEF.



Фиг. 24 Изменение в генната експресия на IL-6 под действие на различни концентрации SEF в условия на EtOH индуцирано възпаление при 3T3-L1 преадипцитни клетки. **К**-контролна група нетретирани клетки; **E2**-0.25%, **E4**-0.5% концентрация на EtOH в хранителна среда; **SEF2**-0.01%, **SEF4**-0.02% w/v съдържание на етилацетатна фракция от плодове на бъзак в хранителна среда.. ** $p < 0.01$ разлика между групите етанол и етанол + SEF. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.

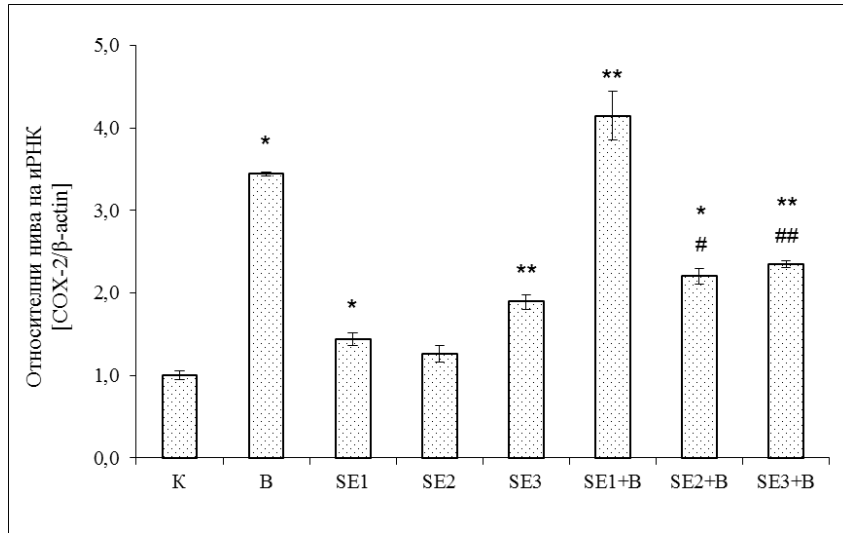
4.3.3.3. Влияние върху транскрипционните нива на COX-2

Нивата на генна експресия на индуцируемата простагландин-ендопероксид синтаза (COX-2) се индуцират над три пъти ($p < 0.05$) при оксидативно стимулирани 3T3-L1 преадипцити (фиг. 25). Самостоятелно високата концентрация на екстракта от 10% стимулира близо два пъти експресията на ензима ($p < 0.01$). При клетките претретирани с екстракта от бъзак се забелязва инхибиране на оксидант индуцираните експресионни нива на COX-2 ($p < 0.01$).

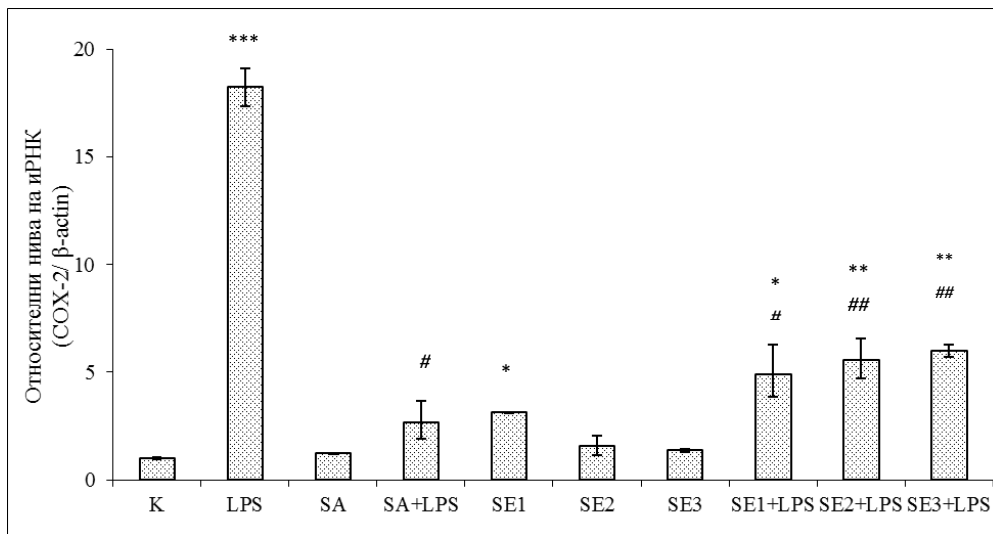
На фигура 26 се вижда, че при LPS третирани клетки експресията на COX-2 се индуцира близо 20 пъти ($p < 0.001$). Подобно на другите провъзпалителни белтъци, ниската доза на екстракт стимулира слабо експресията на ензима ($p < 0.05$). Както позитивната контрола (салицилова

киселина), така и екстрактът потиска експресията на ензима в условия на индуцирано възпаление статистически значимо повече от два пъти ($p < 0.01$).

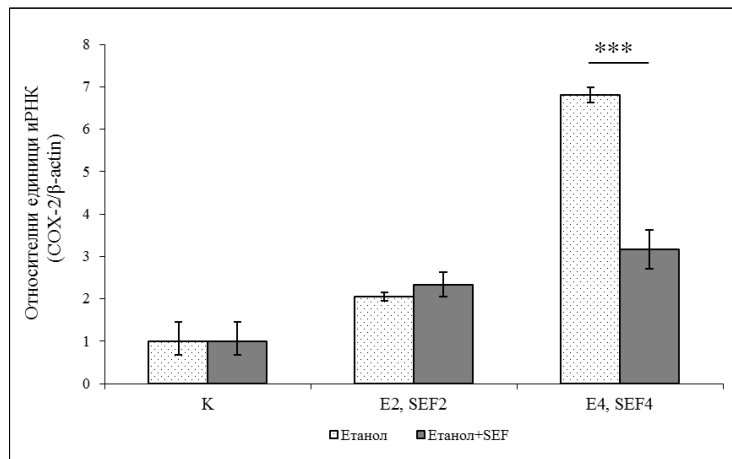
Подобен ефект при преадипоцити има и SEF от бъзак, която редуцира значително етанол индуцирана експресия на COX-2 ($p < 0.001$) (фиг. 27).



Фиг. 25 Изменение в експресията на ензима COX-2 под действие на различни концентрации воден екстракт от бъзак при оксидативно стимулирани 3Т3-Л1 преадипоцитни клетки. **К** – контрола нетретирани клетки; **В** – 100μМ t-ButOOH; **SE1** – 2.5%, **SE2** – 5%, **SE3** – 10% съдържание на екстракт от *S. ebulus* в хранителна среда. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ спрямо *K*; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ спрямо *B*. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.



Фиг. 26 Изменение в експресията на ензима COX-2 под действие на нарастващи концентрации воден екстракт от *S. ebulus* в условия на LPS индуцирано възпаление при J774A.1 макрофаги. **К** – контрола нетретирани клетки; **LPS** – 200ng/ml липополизахариди; **SA** – 100μМ СК; **SE1** – 2.5%, **SE2** – 5%, **SE3** – 10% екстракт от *S. ebulus* в хранителна среда. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо *K*; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ спрямо *LPS*. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.



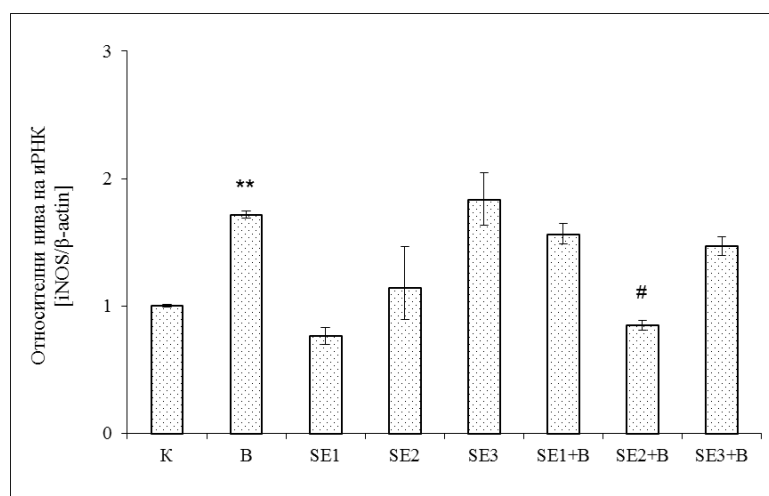
Фиг. 27 Изменение в генната експресия на ензима COX-2 под действие на различни концентрации SEF в условия на EtOH индуцирано възпаление при 3T3-L1 преадипоцитни клетки. **К**-контролна група нетретиранни клетки; **E2**-0.25%, **E4**-0.5% концентрация на EtOH в хранителна среда; **SEF2**-0.01%, **SEF4**-0.02% w/v съдържание на етилацетатна фракция от плодове на бъзак в хранителна среда. $^{***}p < 0.01$ разлика между групите етанол и етанол + SEF. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.

4.3.3.4. Влияние върху транскрипционните нива на iNOS

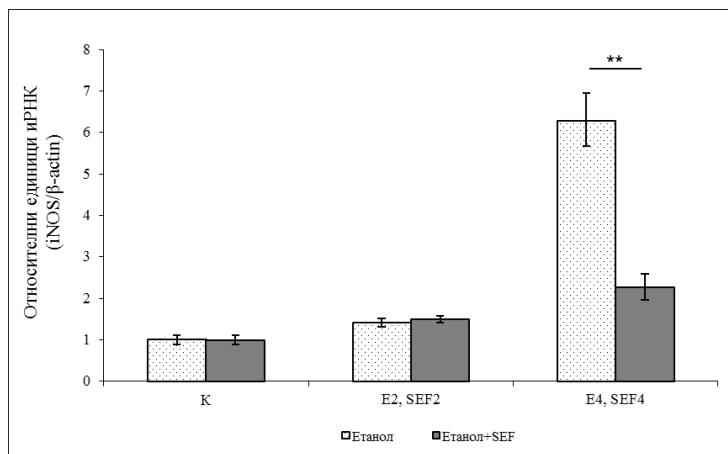
Оксидантът слабо индуцира експресията на iNOS ($p < 0.01$) при преадипоцити (фиг. 28). Докато, подобно на описаните до момента провъзпалителни белтъци, екстрактът сам по себе си показва тенденция на плавно, но не значимо индуциране. Само концентрацията от 5% екстракт в хранителна среда потиска статистически значимо оксидант стимулираната експресия на ензима ($p < 0.01$).

Подобно протективно действие при преадипоцити проявява и SEF като потиска етанол индуцираната експресия на iNOS ($p < 0.01$) (фиг. 29).

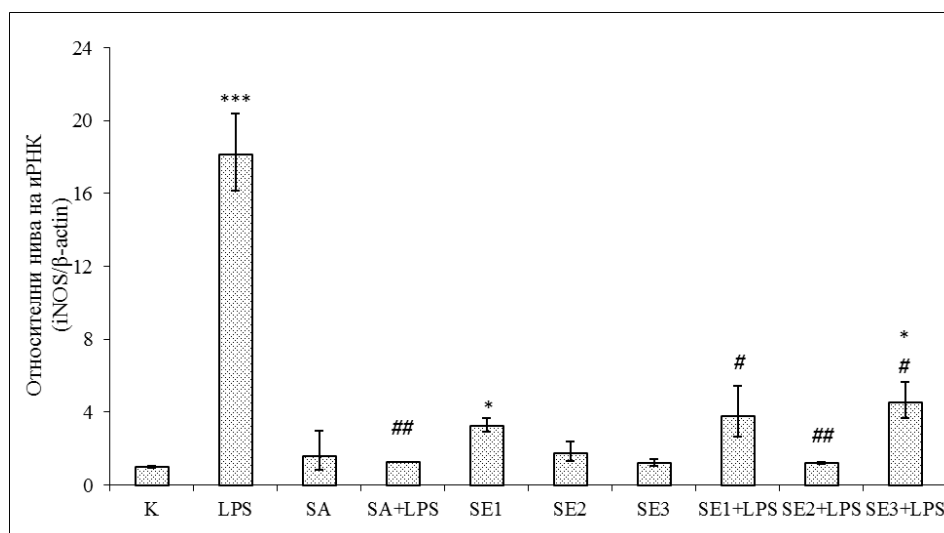
При модела на LPS индуцирано възпаление експресията на ензима при макрофаги нараства близо 20 пъти ($p < 0.001$) (фиг. 30), което има за резултат определяне на почти 12кратно ($p < 0.01$) по високи нива на белтъка в клетките (фиг. 31). Салициловата киселина като инхибитор на COX инхибира и експресията на iNOS ($p < 0.01$). Подобно на нея екстрактът понижава LPS индуцираната експресия на ензима до нива близки до нормалните ($p < 0.01$), като това понижение се наблюдава и при определянето на белтъчните нива ензима ($p < 0.01$). Екстрактът в ниска концентрация сам по себе си индуцира по-малко от 2 пъти белтъчните и транскрипционни нива на ензима ($p < 0.05$).



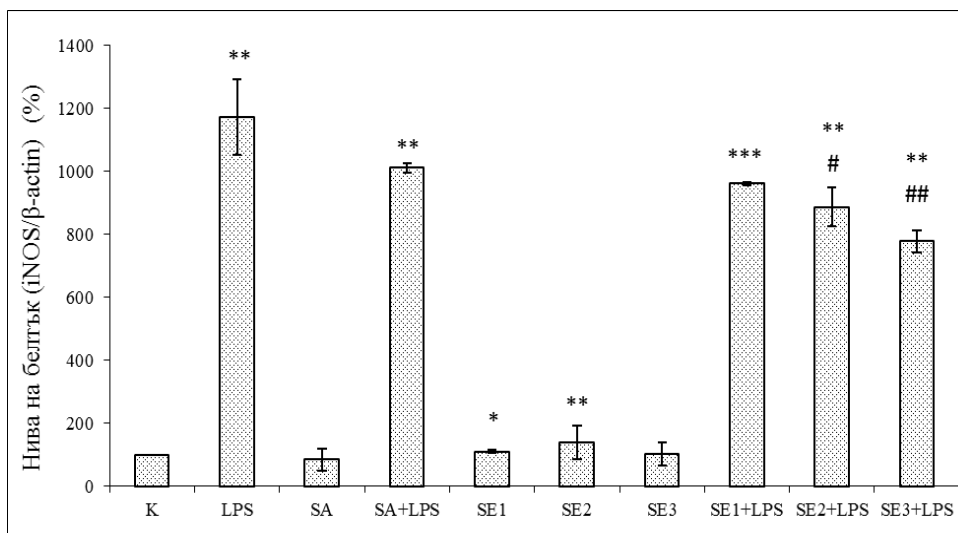
Фиг. 28 Изменение в експресията на ензима iNOS под действие на различни концентрации воден екстракт от бъзак при оксидативно стимулирани 3T3-L1 преадипоцитни клетки. **К** – контрола нетретиранни клетки; **B** – 100μM t-ButOОН; **SE1** – 2.5%, **SE2** – 5%, **SE3** – 10% съдържание на екстракт от *S. ebulus* в хранителна среда. $^{**}p < 0.01$ спрямо К; $\#p < 0.05$ спрямо B. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.



Фиг. 29 Изменение в генната експресия на ензима iNOS под действие на различни концентрации SEF в условия на EtOH индуцирано възпаление при 3T3-L1 преадипоцитни клетки. **К**-контролна група нетретирани клетки; **E2**-0.25%, **E4**-0.5% концентрация на EtOH в хранителна среда; **SEF2**-0.01%, **SEF4**-0.02% w/v съдържание на етилацетатна фракция от плодове на бязък в хранителна среда.. $^{**}p < 0.01$ разлика между групите етанол и етанол + SEF. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.



Фиг. 30 Изменение в експресията на ензима iNOS под действие на нарастващи концентрации воден екстракт от *S. ebulus* в условия на LPS индуцирано възпаление при J774A.1 клетки. **К** – контрола нетретирани клетки; **LPS** – 200ng/ml липополизахариди; **SA** – 100μM СК; **SE1** – 2.5%, **SE2** – 5%, **SE3** – 10% екстракт от *S. ebulus* в хранителна среда. $^{*}p < 0.05$, $^{***}p < 0.001$ спрямо К; $^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#}p < 0.01$ спрямо LPS. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.



Фиг. 31 Изменение в нивата на ензима iNOS под действие на нарастващи концентрации воден екстракт от *S. ebulus* в условия на LPS индуцирано възпаление при J774A.1 макрофаги. **К** – контрола нетретираните клетки; **LPS** – 200ng/ml липополизахариди; **SA** – 100μM салицилова к-на; **SE1** – 2.5%, **SE2** – 5%, **SE3** – 10% екстракт от *S. ebulus* в хранителна среда. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ спрямо LPS. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.

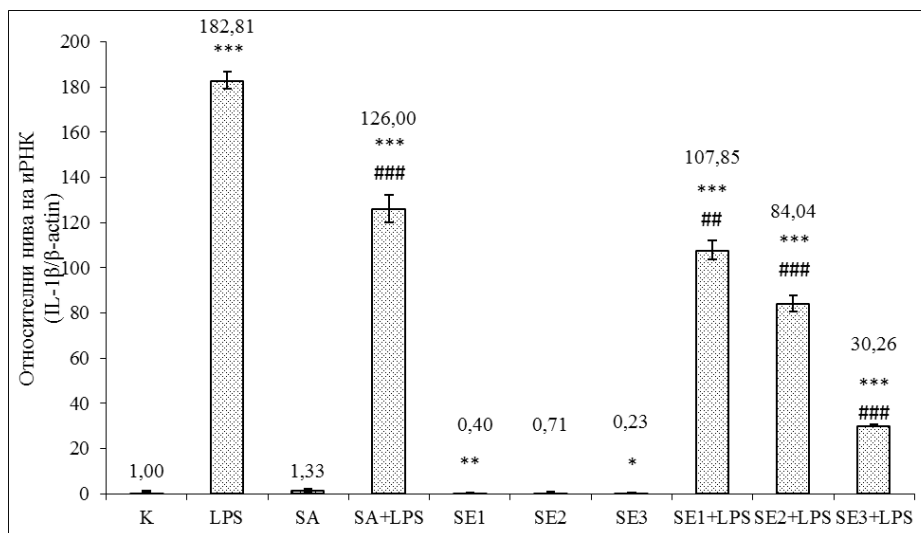
4.3.3.5. Влияние върху транскрипционните нива на IL-1β и IL-1RN

IL-1β е сред основните цитокини отговорни за острата фаза на възпаление, редом с IL-6 и TNFα. Под действие на LPS в макрофагите генната експресия за IL-1β се индуцира изключително силно (до 182 пъти), което говори еднозначно за силата му като провъзпалителен медиатор ($p < 0,001$) (фиг. 32). Салициловата киселина като инхибитор на възпалението понижава LPS индуцираната експресия на цитокина с около 30% ($p < 0,001$). Претретирането с екстракт имаше изключително силно инхибиращо действие върху генната експресия на IL-1β дори по-силно, от положителната контрола като 2,5% екстракт понижи до 107 пъти ($p < 0,01$) и 10% екстракт до 30 пъти ($p < 0,001$) LPS индуцираната му експресия.

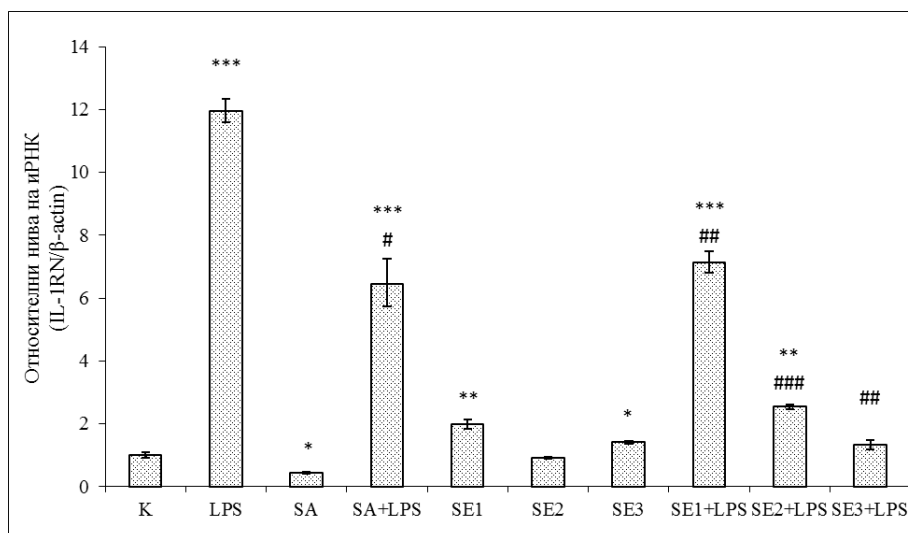
В условия на активирано възпаление нивата на IL-1RN се индуцират до 12 пъти ($p < 0,001$) в сравнение с нетретираната контролна група клетки (фиг. 33). Ниската концентрация от 2,5% екстракт в хранителна среда редуцираха LPS индуцираната експресия на иРНК два пъти ($p < 0,05$), като по-високите концентрации постепенно ги понижиха ($p < 0,001$), до достигане на нормални нива, ефект по-силен от ефекта на положителната контрола салицилова киселина.

Интересно бе да се наблюдава как екстрактът сам по себе си индуцира до два пъти експресията на IL-1RN ($p < 0,01$) (фиг. 33), като същите концентрации понижиха експресията на самият IL-1β ($p < 0,01$) (фиг. 32).

Забелязва се, че най-ниската концентрация на екстракта има по-силен имуностимулаторен ефект върху експресията на белтъците, когато се прилага без индукция на възпаление, докато в условия на индуцирано възпаление най-високата концентрация на екстракта има най-силно протективно действие.



Фиг. 32 Изменение в експресията на белтъка IL-1β под действие на нарастващи концентрации воден екстракт от *S. ebulus* в условия на LPS индуцирано възпаление при J774A.1 макрофаги. **K** – контрола нетретирани клетки; **LPS** – 200ng/ml липополизахариди; **SA** – 100μM салицилова к-на; **SE1** – 2.5%, **SE2** – 5%, **SE3** – 10% екстракт от *S. ebulus* в хранителна среда. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо; ### $p < 0.01$, #### $p < 0.001$ спрямо LPS. Представени са средните стойности за всяка една група ± SEM.

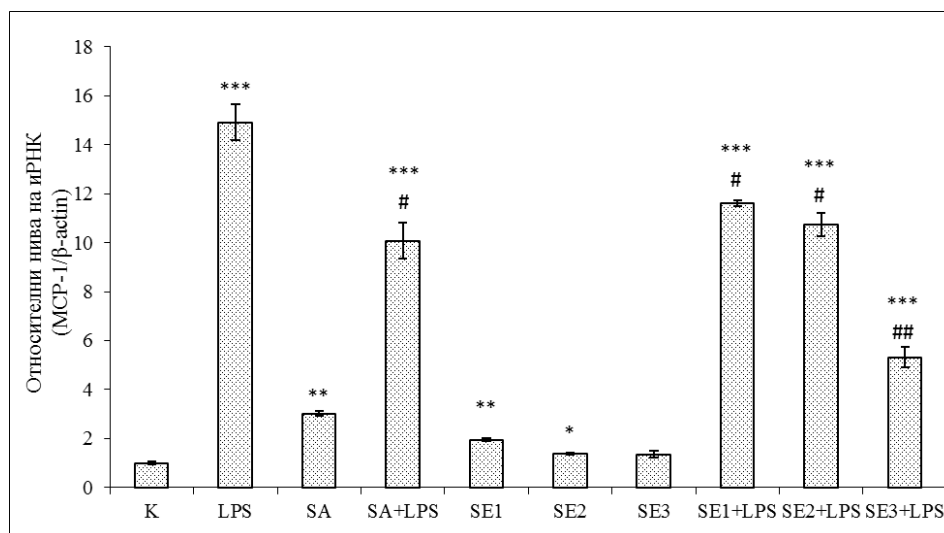


Фиг. 33 Изменение в експресията на белтъка IL-1RN под действие на нарастващи концентрации воден екстракт от *S. ebulus* в условия на LPS индуцирано възпаление при J774A.1 макрофаги. **K** – контрола нетретирани клетки; **LPS** – 200ng/ml липополизахариди; **SA** – 100μM салицилова к-на; **SE1** – 2.5%, **SE2** – 5%, **SE3** – 10% екстракт от *S. ebulus* в хранителна среда. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, #### $p < 0.001$ спрямо LPS. Представени са средните стойности за всяка една група ± SEM.

4.3.3.6. Влияние върху транскрипционните нива на MCP-1

Моноцитен хемоатрактантен протеин (MCP-1 или CCL2) е хемокин, способстващ инфилтрацията на моноцити и макрофаги във възпалената тъкан, например в мастна тъкан при затлъстяване, като повишените му нива се свързват с инсулинова резистентност (Kanda et al., 2006; Lesniewski et al., 2007).

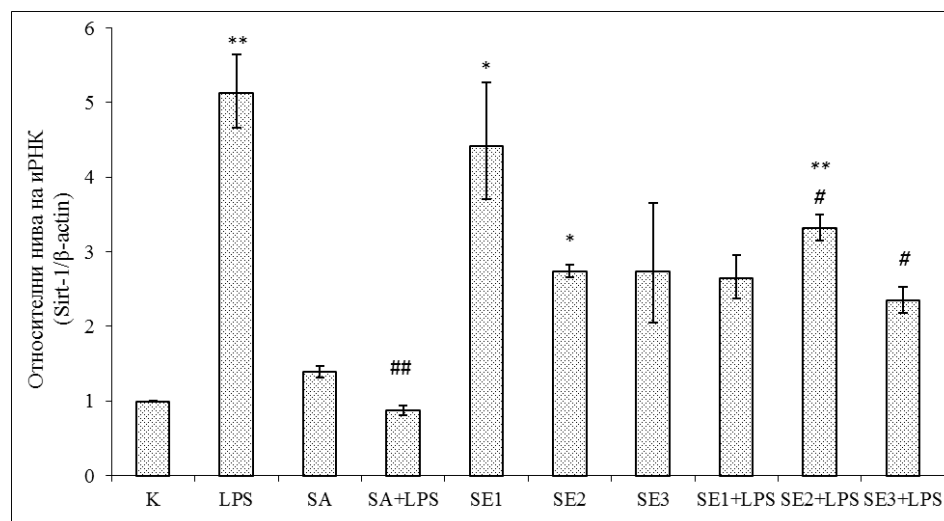
При стимулирани с LPS макрофаги експресията на хемокина се индуцира до 15 пъти ($p < 0,001$) (фиг. 34). При клетки претретирани с воден екстракт в условия на индуцирано възпаление транскрипцията на гена за MCP-1 постепенно се понижава ($p < 0,01$) в сравнение с LPS третираната контролна група. Екстрактът сам по себе си индуцира слабо, но значимо ($p < 0,01$) експресията на хемокина, аналогично на анализираниите до момента възпалителни протеини.



Фиг. 34 Изменение в експресията на белтъка MCP-1 под действие на нарастващи концентрации воден екстракт от *S. ebulus* в условия на LPS индуцирано възпаление при J774A.1 макрофаги. **К** – контрола нетретирани клетки; **LPS** – 200ng/ml липополизахариди; **SA** – 100 μ M салицилова к-на; **SE1** – 2.5%, **SE2** – 5%, **SE3** – 10% екстракт от *S. ebulus* в хранителна среда. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ спрямо LPS. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.

4.3.3.7. Влияние върху транскрипционните нива на Sirt-1

В отговор на възпаление генната експресията на хистон деацетилазита Sirt-1 се повиши близо 5 пъти ($p < 0,01$) (фиг. 35). Екстрактът също индуцира самостоятелно експресията на ензима, като най-силен е ефектът на ниската концентрация ($p < 0,05$), подобно на IL-1RN (фиг. 33). В условия на възпаление при претретирани с екстракта клетки, индуцираната от LPS генна експресия на Sirt-1 се понижава ($p < 0,05$).



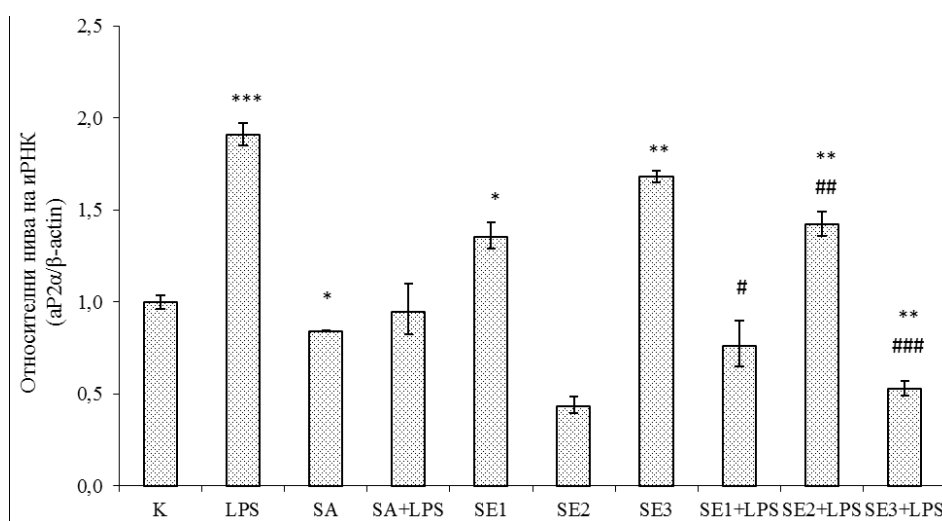
Фиг. 35 Изменение в експресията на белтъка Sirt-1 под действие на нарастващи концентрации воден екстракт от *S. ebulus* в условия на LPS индуцирано възпаление при J774A.1 макрофаги. **К** – контрола нетретирани клетки; **LPS** – 200ng/ml липополизахариди; **SA** – 100 μ M салицилова к-на; **SE1** – 2.5%, **SE2** – 5%, **SE3** – 10% екстракт от *S. ebulus* в хранителна среда. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ спрямо; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ спрямо LPS. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.

4.3.3.8. Влияние върху транскрипционните нива на aP2 (FABP4), ICAM-1, Nox1

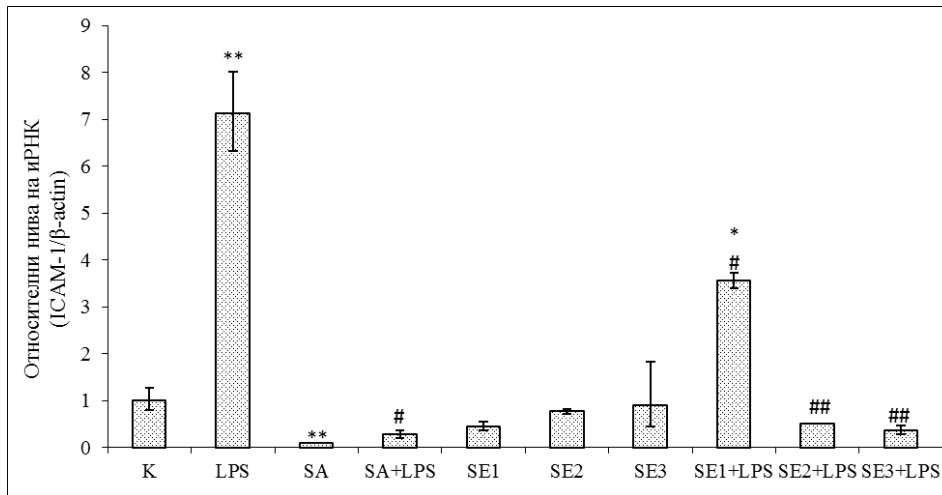
В условия на стимулирано възпаление при макрофаги се активира генната експресия на адипоцит-специфичния ВМК свързващ белтък aP2 (FABP4) близо 2 пъти ($p < 0,001$) (фиг. 36). В условия на LPS индуцирано възпаление при претретираните с екстракт клетки експресията на гена за aP2 се инхибира ($p < 0,001$). Третирането само с екстракт индуцира по-слабо, но статистическо значимо повишение ($p < 0,05$).

Генът за интрацелуларния адхезионен протеин (ICAM-1) в LPS третираната група се експресира 7 пъти по-силно ($p < 0,01$) отколкото контролната група нетретирана, за разлика от което при претретиране с екстракт в условия на възпаление експресията му се понижава значително ($p < 0,001$) спрямо LPS третираните клетки (фиг. 37). Екстрактът самостоятелно не повлиява генната експресия на белтъка.

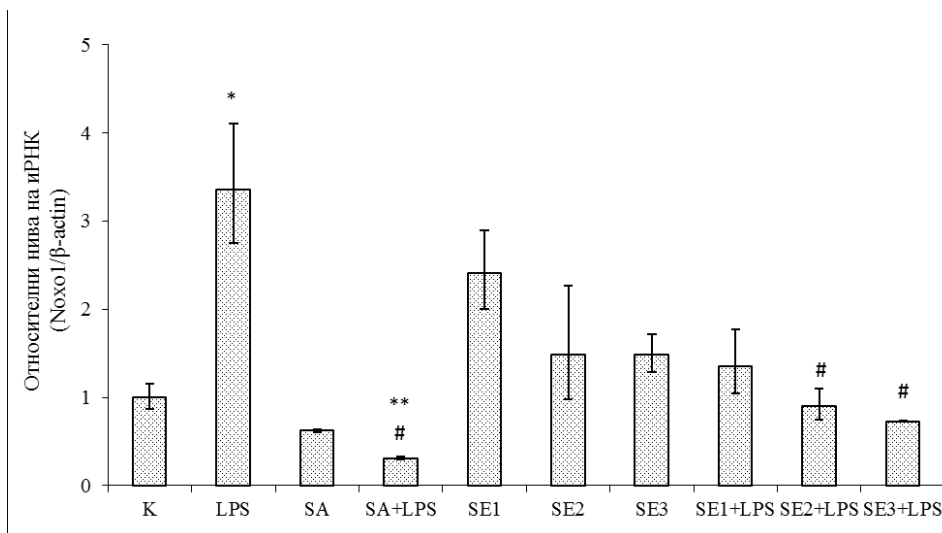
Nox1 субединицата на НАДФ.Н оксидазата също се стимулира ($p < 0,05$) в условия на индуцирано възпаление (фиг. 38). Претретирането с екстракт понижава нивата на иРНК на белтъка в условията на възпаление до нормални граници ($p < 0,05$), докато самостоятелно билковият екстракт не повлиява генната експресия Nox1.



Фиг. 36 Изменение в експресията на белтъка aP2α под действие на нарастващи концентрации воден екстракт от *S. ebulus* в условия на LPS индуцирано възпаление при J774A.1 макрофаги. **K** – контрола нетретирана клетки; **LPS** – 200ng/ml липополизахариди; **SA** – 100μM салицилова к-на; **SE1** – 2.5%, **SE2** – 5%, **SE3** – 10% екстракт от *S. ebulus* в хранителна среда. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ спрямо LPS. Представени са средните стойности за всяка една група ± SEM.



Фиг. 37 Изменение в експресията на белтъка ICAM-1 под действие на нарастващи концентрации воден екстракт от *S. ebulus* в условия на LPS индуцирано възпаление при J774A.1 макрофаги. **К** – контрола нетретирани клетки; **LPS** – 200ng/ml липополизахариди; **SA** – 100μM салицилова к-на; **SE1** – 2.5%, **SE2** – 5%, **SE3** – 10% екстракт от *S. ebulus* в хранителна среда. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ спрямо LPS. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.



Фиг. 38 Изменение в експресията на белтъка Nox1 под действие на нарастващи концентрации воден екстракт от *S. ebulus* в условия на LPS индуцирано възпаление при J774A.1 макрофаги. **К** – контрола нетретирани клетки; **LPS** – 200ng/ml липополизахариди; **SA** – 100μM салицилова к-на; **SE1** – 2.5%, **SE2** – 5%, **SE3** – 10% екстракт от *S. ebulus* в хранителна среда. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ спрямо; # $p < 0.05$ спрямо LPS. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.

Обсъждане

Нискостепенното възпаление и активирането на вродения имунен отговор са тясно свързани с патогенезата на диабет тип 2 и свързаните с него състояния като дислипидемия и атеросклероза (Pickup, 2004). Свързаната със затлъстяване инсулинова резистентност се дължи основно на завишените нива на цитокините TNF α и IL-6, продуцирани от мастната тъкан. Главните тъканно специфични сигнални пътища, свързани с развитието на възпалителен процес зависят от NF- κ B и JNK киназа (Bastard et al., 2006).

Антиатерогенният ефект на някои полифеноли се свързва, както с повлияване на оксидативния стрес, така и с хиполипидемичното им действие (Hayek et al., 1997; Waddington et al., 2004). Противовъзпалителният им ефект се дължи на пониженото активиране на макрофаги и Т-лимфоцити и потисната продукция на цитокини и хемокини или техните рецептори. Полифеноли като ресвератрол, катехин и кверцетин потискат NF- κ B зависимата продукция на хемокините ICAM и VCAM в ендотелни клетки, както и експресията на MCP-1 рецепторите CCR1 и CCR2 (Norata et al., 2007; Pellegatta et al., 2003). Инхибирането на последните понижава хемотаксиса на левкоцити към мястото на възпаление и последващата повишена продукция на IL-6.

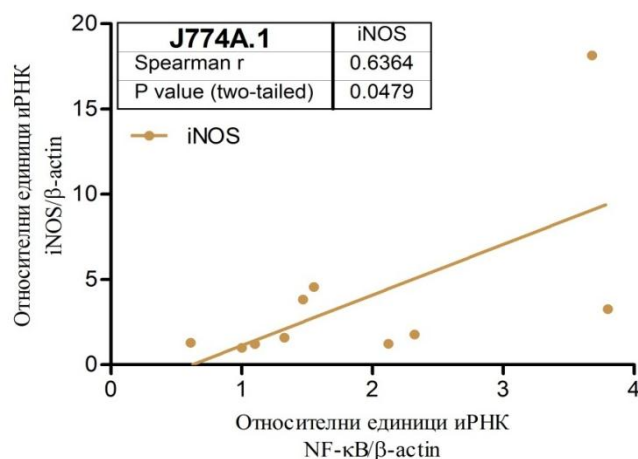
Така например, полифеноли от боровинка понижават възпалението *in vitro* като понижават продукцията на простаноиди (Russell, 2007; Youdim et al., 2002). Антоцианиновите метаболити редуцират TNF α индуцираната експресия на MCP-1 и ICAM, понижавайки оксидативния стрес. В модели на LPS индуцирано възпаление при макрофаги е доказано, че антоцианидините инхибират COX-2, повлиявайки MAPK киназния сигнален път (Hou et al., 2005; Pergola et al., 2006). Основният и най-разпространен антоцианин, откриван в растенията, е цианидин-3-*O*-глюкозид. Той инхибира биосинтезата на iNOS. Индуцирана при астма, COX-2 също се инхибира от антоцианини при експериментален модел на мишки. При същият модел на астма се посочва инхибиране на iPK за TNF α , IL-6, IL-13 и други от страна на антоцианините.

Ключова роля при индуцирането на възпаление при затлъстяване играе NF- κ B транскрипционният фактор. Същият транскрипционен фактор се активира и при оксидативен стрес. При клинично изследване с хора е анализирано и доказано инхибирането на същия транскрипционен фактор от богати на антоцианини растения (Karlsen et al., 2007). При същото изследване в модел на LPS индуцирано възпаление при моноцити изолирани от касис и къпина полифеноли инхибират NF- κ B.

Водният екстракт от бъзак самостоятелно в ниски концентрации индуцира слабо експресията на провъзпалителните ензими COX-2 и iNOS, а на цитокина TNF α по-силно и значимо при макрофаги в сравнение с преадипоцити. Също така при макрофаги се индуцира слабо, но значимо и експресията на IL-6, MCP-1 и антагониста на рецептора за IL-1 (IL-1RN), за разлика от който експресията на самият IL-1 β е слабо, но статистическо понижена.

Тези резултати потвърждават приложението на плодовете от бъзак и приготвените от тях екстракти, сироп и др. в народната медицина за стимулиране на имунитета. Факта, че водният екстракт индуцира слабо провъзпалителните белтъци и при двата модела, вероятно е в основата на имуностимулиращото му действие. Предполага се, че стимулирането на имунитета повишава способността на организма за адаптация при инфекции и възпаления. Понижените нива на TNF α в адипозна тъкан при затлъстели индивиди са свързани с подобряване на инсулиновата чувствителност (Hotamisligil et al., 1993).

Фактори на възпалението като IL-1 β , TNF α са сред основните медиатори на възпалителния процес и стимулират допълнително генната експресия на COX-2 и синтезата на простагландин E2 (Kim et al., 1998; Zhu et al., 2002, 2003), което води до амплифициране на възпалителния отговор. LPS стимулират генната експресия, както на цитокините IL-1 β , TNF α и IL-6, така и на вътреклетъчният адхезионен белтък ICAM, на хемокина MCP-1 и на ензимите COX-2 и iNOS, чрез активиране на NF- κ B зависимия сигнален път (van de Stolpe et al., 1994; Ueda et al., 1994; Hsieh et al., 2011; Tan et al., 2006; Kim et al., 2009; Maraslioglu et al., 2014). Потискането на експресионните нива на NF- κ B понижава в следствие и генната експресия на всичките цитокини и възпалителни ензими, включително и белтъчните нива на iNOS, чиито транскрипции той контролира. Това обяснява защо претретираните с екстракт макрофаги в условия на индуцирано възпаление понижават експресията на анализирания възпалителни белтъци, в сравнение с третираната само с LPS контролна група. Това се потвърждава и от корелационните анализи, показващи зависимостта между експресионните нива на NF- κ B и iNOS (Фиг. 39).



Фиг. 39 Зависимост между транскрипционните нива на NF-κB и iNOS при J774A.1 макрофаги в модел на LPS индуцирано възпаление.

При оксидативно стимулирани преадипоцитни клетки, претретиран с екстракт, транскрипционните нива на COX-2, iNOS и TNFα са по-ниски. В модела на етанол индуцирано възпаление, в резултат от последващ оксидативен стрес, експресията на COX-2, iNOS и TNFα, IL-6 се повишават значително, докато при преадипоцитите, котретиран с етанол и SEF експресионните нива на същите белтъци са значително по-ниски ($p < 0.01$). Това говори за противовъзпалителното действие на екстрактите. В основата на това им действие вероятно лежи способността на съдържащите се в него полифеноли, сред които не малка част антоцианини, да обезвреждат свободни радикали, които по принцип биха активирали COX-2 и продукцията на простагландин E2. По литературни данни полифенолите са способни да инхибират възпалителния процес, потискайки NF-κB и активираната от него експресия на провъзпалителни белтъци.

LPS стимулираната експресия на COX-2 и iNOS се медира и от протеин киназа C сигналната каскада (Zhu et al., 2012). В същото това изследване на Zhu и съавтори се посочва, че продукцията на пероксинитрити ONOO⁻, в резултат от индуцирането на iNOS, стимулира допълнително генната експресия на ензима COX-2 и продукцията на простагландин E2. Можем да предположим, че екстрактите от плодове на бъзак инхибират транскрипцията на ензимите не само чрез повлияване на NF-κB. Вероятно способността на водният екстракт от плодове на бъзак да свързва NO радикали (Ebrahimzadeh et al., 2010) е допълнителен механизъм за понижаване активността на COX-2 и продукцията на простагландини.

Sirt-1 е сред най-изследваните протеини от класа на сиртуин (клас III) хистон деацетилазите, чието активиране подобрява инсулиновата резистентност при затлъстяване (Milne et al., 2007), като му се приписва и противовъзпалително действие (Olefsky and Glass, 2010). Активността на НАД-зависима хистон деацетилаза Sirt-1, се свързва с продължителността на жизнения цикъл при ограничен калориен прием. Свърхпродукцията на този ензим се свързва с подобряване на глюкозния метаболизъм в миши модели на затлъстяване. Изследвания потвърждават, че дефицитът на Sirt-1 може да доведе до състояния, чиято патогенеза има в основата си нарушена инсулинова сигнализация. В мишки на високо липидна диета се наблюдават понижени нива на ензима, което корелира с инсулинова резистентност (Deng et al., 2007). Деацетилирането на транскрипционния фактор Foxo1 прави възможно свързването му с C/EBPα, което индуцира транскрипцията на адипонектин при адипоцити (Qiao et al., 2006). Sirt-1 участва и в процеса на възпаление, деацетилирайки p65 субединицата на NF-κB (Yeung et al., 2004), докато свърхацетилиране на p65 субединицата инхибира нивата на НАД-зависимата деацетилаза (Yang et al., 2007). Маркери на възпалението като ICAM и TNFα се индуцират при възпаление, както и според получените резултати при настоящото изследване. Активатор на Sirt-1 като ресвератрол могат да инхибират тяхната индукция (Csiszar et al., 2008). Активирането на Sirt-1 подобрява инсулиновата чувствителност, потискайки TNFα индуцираното деацетилиране на NF-κB (Yeung et al., 2004, Yang et al., 2007).

Макрофагите, третирани с ацетлсалицилова киселина и LPS, имат много по-ниска експресия на деацетилазата в сравнение с клетките, третирани само с LPS, вероятно поради свърхацетилиране на NF-κB p65 субединицата от страна на салициловата киселина. Друг важен факт, който установихме е, че експресията на почти всички провъзпалителни белтъци се инхибира

много по-слабо от третирането със салицилова киселина, освен COX-2 и iNOS. Можем да предположим, че салицилатите като инхибитори на COX инхибират и функциониращата в синхрон с нея iNOS. Вероятно индукцията на останалите провъзпалителни белтъци чрез индукция на NF- κ B става по независими от продукцията на простагландин E2 пътища.

При елиминиране на Sirt-1 в адипоцити глюкозният транспорт се инхибира, като нивата на инкорпориран в мембраната GLUT4 намаляват. Това се съпровожда от увеличено фосфорилиране на JNK и серинови остатъци от IRS-1 белтъци, което потиска инсулиновата сигнализация. За разлика от това активирането на Sirt-1 повишава глюкозния транспорт, инсулиновата сигнализация и понижава сериновото фосфорилиране в критичния за инсулиновата сигнална каскада IRS-1 (Yoshizaki et al., 2009). Същият механизъм лежи и в основата на TNF индуцираната инсулинова резистентност. Инхибиторите на възпалението подобряват по подобен механизъм инсулиновата чувствителност.

Самият екстракт сам по себе си индуцира експресията на Sirt-1. Същото се наблюдава и при макрофагите, третирани с екстракт и LPS. Тези резултати дават основание да се спекулира, че това би довело до индукция на белтъци като адипонектин, който се свързва с повишена инсулинова чувствителност. Подобни разсъждения дават основание да се предположи друг вероятен механизъм, по който екстрактът би проявил противовъзпалителното си действие и би повишил инсулиновата чувствителност.

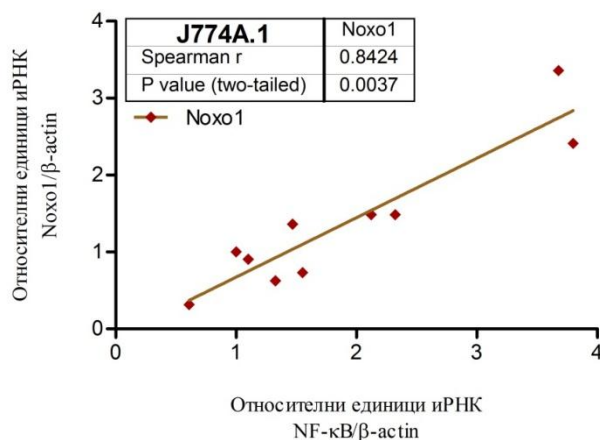
Нивата на свободни ВМК при развитие на инсулинова резистентност са повишени и дори могат да бъдат използвани като маркер за предсказване на диабет тип 2 (Roden 2006). Освен това, те могат да се повишат и при богата липидна диета, засилена *de novo* синтеза, или липолиза в мастна тъкан. В кръвта ВМК се пренасят от ВМК-свързващи белтъци (FABP). В настоящото изследване при макрофаги в условия на индуцирано възпаление бе анализирана експресията на адипоцит-специфичния ВМК-свързващ белтък aP2 (FABP4). Той се експресира, както в адипоцити, така и в макрофаги и се индуцира в условия на LPS индуцирано възпаление (Makowski et al., 2001; Kazemi et al., 2005). Макрофагите са специфични таргетни клетки за aP2 и дефицитът му при тях предотвратява развитието на атеросклероза (Makowski et al., 2001; Boord et al., 2002).

Инсулиновата резистентност, характерна за диабет тип 2, високостепенно затлъстяване е свързана с развитието и на атеросклероза. Високите концентрации на свободни висши мастни киселини (ВМК) са с провъзпалително действие и могат да активират TLR4 свързани сигнални каскади, също както и LPS (Olefsky and Glass, 2010). Инхибирането на aP2 в модели на индуцирано затлъстяване и инсулинова резистентност/ тип 2 диабет при мишки намалява формирането на атеросклеротични лезии, както и образуването на пенести клетки (Furuhashi et al., 2007). Според същото изследване потискането на aP2 повишава инсулиновата чувствителност с последващ глюкозен толеранс. Един възможен механизъм за терапия на инсулинова чувствителност и атеросклероза е инхибирането на aP2 бетъка.

Очаквано, третирането с LPS повиши експресията на aP2, като същият ефект, но в по-ниска степен прояви и екстрактът, приложен самостоятелно (фиг. 36). Протективното действие на екстракта се проявява в случаите на индуцирано възпаление, при които претретирането с екстракт понижава значително LPS индуцираната експресия на aP2. Това вероятно е един от механизмите, чрез които екстрактът потиска активираното възпаление, което се подкрепя и от други научни изследвания, при които инхибирането на aP2 потиска нивата на провъзпалителните цитокини MCP-1, IL-1 β , IL-6 и TNF α (Furuhashi et al., 2007).

НАДФ.Н оксидазата (NOX), е един от основните ензими в съдовите ендотелни клетки, катализира образуването на супероксиден радикал (Dzau, 2001; Drummond et al., 2011). Повишената активност на ензима и експресията на отделни негови субединици имат съществена роля в продуцирането на оксидативен стрес при патологични състояния (Touyz, 2004; Guzik et al., 2000). Повишената генна експресия на p47phox субединицата (Nox1) е открита в артерии на пациенти със ССЗ и диабет тип 2. Ендотелната NOS, както и iNOS продуцират NO, който реагирайки със супероксиден анион радикал образува нитритни пероксиди с изключително силно окислително действие (Blough and Zafiriou, 1985; Gryglewski et al., 1986). Като оксидант пероксинитритите окисляват лесно и бързо свободния глутатион, цистеин и тетрахидробиотерин и понижават редуционния капацитет, което е в основата на силния оксидативен стрес, резултат от активирането на NOX (Szabo et al., 2007). Ензимът е с висока активност в активирани макрофаги, при които взема участие в респираторния взрив, целящ унищожаване на бактериалните клетъчни стени (Segal, 2005; Leto and Geiszt, 2006). Макрофагите са провъзпалителни клетки, опосредстващи образуването на атеросклеротична плака и в същото време експресирайки най-

силно NOX. Те са сред отговорните фактори за развитието на атеросклероза при гризачи, примати и хора (Galkina and Ley, 2009; Kalinina et al., 2002). NOX е сред новоутвърдените прицелни молекули при терапията на хипертония и атеросклероза, съпътстващи патологии като диабет и ССЗ (Drummond et al., 2011). Екстрактът от бязак понижава значимо LPS индуцираната експресия на Noxo1 субединицата на NOX1 и NOX2, като концентрации от 5% и 10% неутрализират напълно индуцираните транскрипционни нива. Потискайки LPS индуцираната генна експресия на Noxo1, плодовете от *S. ebulus* проявяват силно антиоксидантно и противовъзпалително действие, разкривайки потенциалното му антиатерогенно действие. Предполага се, че NOX и по-специално Noxo1 субединицата заема важна роля при IL-1 β зависимото активиране на NF- κ B (Gu et al., 2003). Това обяснява интересния факт, че нивата на генна експресия на Noxo1 корелираха статистически значимо ($p < 0,01$) с генната експресия на NF- κ B транскрипционния фактор (фиг. 40). Следователно, инхибирането на генната експресия на Noxo1 вероятно е един от механизмите, чрез които плодовете от бязак потискат NF- κ B зависимата експресия на провъзпалителни белтъци, такива като iNOS например.



Фиг. 40 Зависимост между транскрипционните нива на NF- κ B и Noxo1 при J774A.1 макрофаги в модел на LPS индуцирано възпаление.

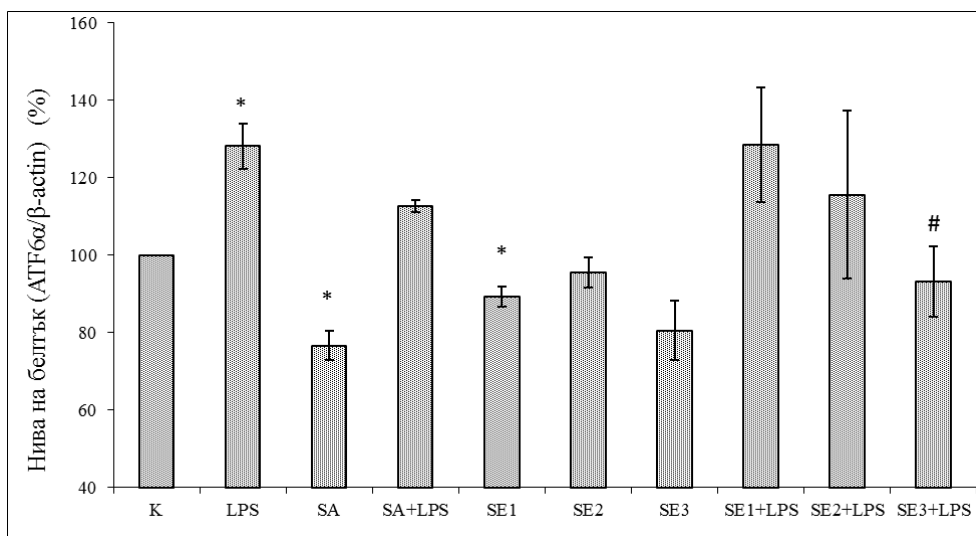
Настоящите резултати разкриват потенциала на бязак като билка със силно антиоксидантно и противовъзпалително действие. Повлияването на белтъци, пряко свързани с продукцията на свободни радикали и провъзпалителни цитокини и хемокини разкрива механизма, по който плодовете от бязак проявяват тези свои действия. Разкриването на тези механизми прави още по възможно ефективното приложение на билката при превенция и терапия на патологични състояния, съпътствани от развитието на силен оксидативен стрес и възпаление, каквито са атеросклерозата, ССЗ, инсулинова резистентност и други.

4.3.3.9. Влияние върху нивата на ER стрес свързани протеини

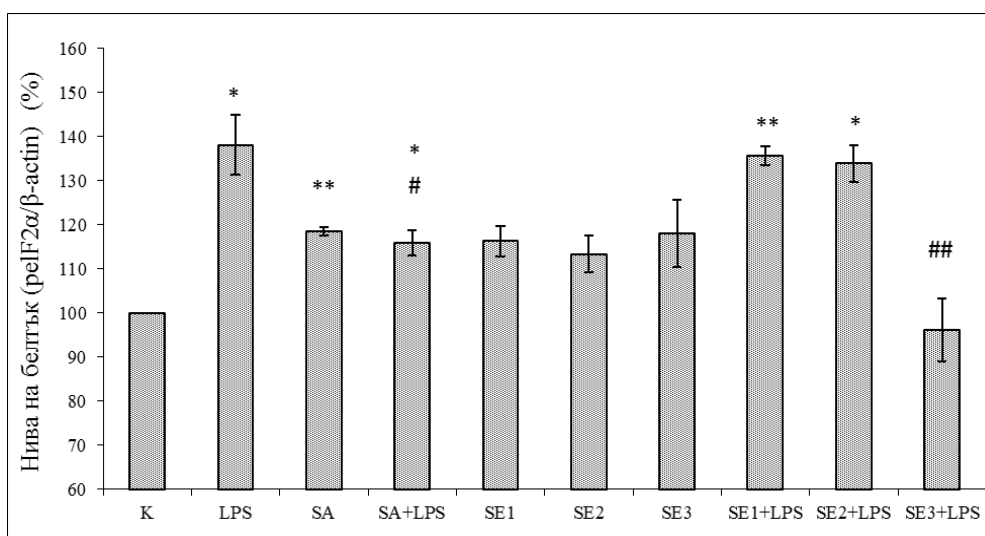
Белтъчните нива на транскрипционните фактори, отговорни за експресията на CHOP, а именно ATF6 α и фосфорилиран eIF2 α (peIF2 α , eukaryotic initiation factor 2) се повишават в резултат от третирането с LPS (фиг. 41 и 42) ($p < 0,05$ и за двата белтъка), екстрактът приложен самостоятелно, индуцира с 16% фосфорилирането на eIF2 α (фиг. 42), но ниската му концентрация понижава с 10% нивата на белтъка ATF6 α (фиг. 41). Самостоятелният ефект на екстракта съвпада с този на салициловата киселина. Тя понижава белтъчните нива на ATF6 α с близо 24% ($p < 0,05$) и повишава с 18% ($r < 0,01$) нивата на peIF2 α . В условия на индуцирано възпаление и ER стрес претретирането с 10% екстракт значително понижава LPS индуцираните нива на ATF6 α ($p < 0,05$) и peIF2 α ($p < 0,01$) белтъците до нормални такива.

В съответствие с активността на транскрипционните фактори се изменят и белтъчните нива на CHOP (фиг. 43). С увеличаване на концентрацията му екстрактът, приложен самостоятелно, постепенно понижава белтъчните нива на CHOP ($p < 0,01$). Третирането с LPS стимулира с 54% ($p < 0,05$) вътреклетъчните нива на протеина. Протективното действие на екстракта се свежда до понижаване индукцията на CHOP от страна на LPS, като 10% екстракт има

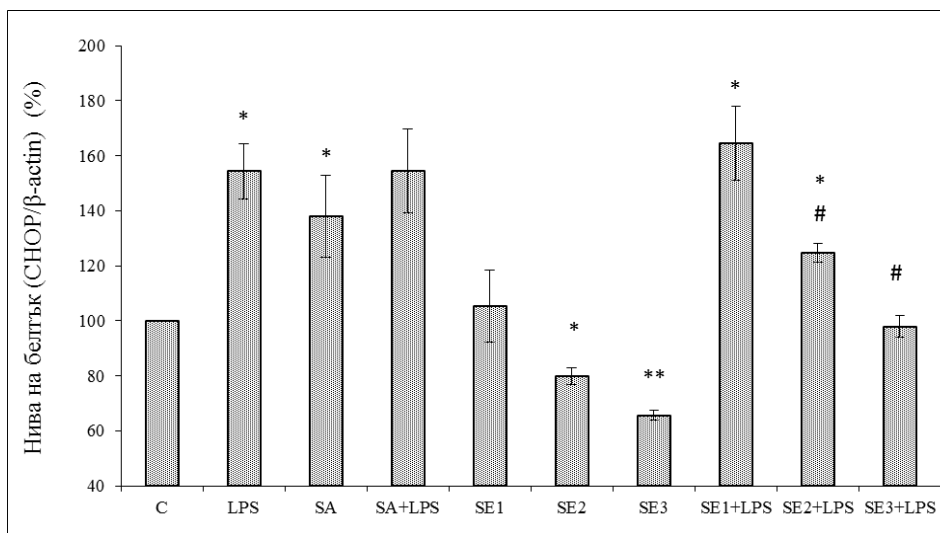
най-силен ($p < 0,01$) ефект. Явно потискането на възпалението вероятно под действие на съдържащите се в екстракта полифеноли потиска и ER стреса.



Фиг. 41 Изменение в нивата на белтъка ATF6α под действие на нарастващи концентрации воден екстракт от *S. ebulus* в условия на LPS индуцирано възпаление при J774A.1 макрофаги. **K** – контрола нетретирани клетки; **LPS** – 200ng/ml липополизахариди; **SA** – 100μM салицилова к-на; **SE1** – 2.5%, **SE2** – 5%, **SE3** – 10% екстракт от *S. ebulus* в хранителна среда. * $p < 0.05$ спрямо; # $p < 0.05$ спрямо LPS. Представени са средните стойности за всяка една група ± SEM.



Фиг. 42 Изменение в нивата на белтъка pelf2α под действие на нарастващи концентрации воден екстракт от *S. ebulus* в условия на LPS индуцирано възпаление при J774A.1 макрофаги. **K** – контрола нетретирани клетки; **LPS** – 200ng/ml липополизахариди; **SA** – 100μM салицилова к-на; **SE1** – 2.5%, **SE2** – 5%, **SE3** – 10% екстракт от *S. ebulus* в хранителна среда. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ спрямо; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ спрямо LPS. Представени са средните стойности за всяка една група ± SEM.



Фиг. 43 Изменение в нивата на CHOP под действие на нарастващи концентрации воден екстракт от *S. ebulus* в условия на LPS индуцирано възпаление при J774A.1 макрофаги. К – контрола нетретирани клетки; LPS – 200ng/ml липополизахариди; SA – 100μM салицилова к-на; SE1 – 2.5%, SE2 – 5%, SE3 – 10% екстракт от *S. ebulus* в хранителна среда. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ спрямо; # $p < 0.05$ спрямо LPS. Представени са средните стойности за всяка една група \pm SEM.

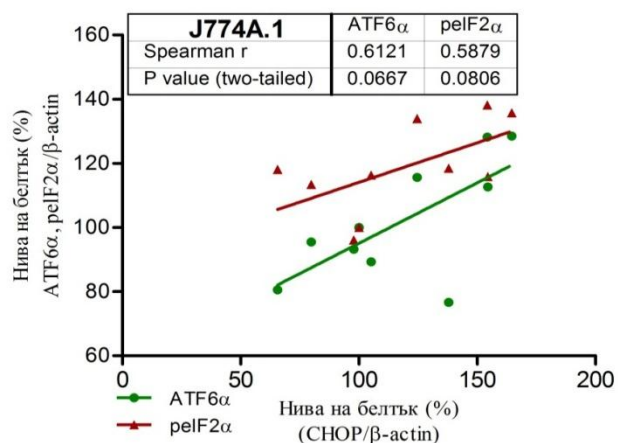
Обсъждане

Активирането на макрофагите в мастната тъкан при затлъстяване се дължи предимно на множество проинфламаторни събития. Например, освен главната си функция, т.е. синтеза на белтъци, ендоплазматичният ретикулум може да реагира на нутриенти, което може да активира стрес, свързан с неправилна конформация на новосинтезирани белтъци, т.нар. “UPR”-unfolded protein response или ER стрес (Gregor and Hotamisligil, 2007; Ron and Walter, 2007; Eizirik et al., 2008; Ozcan et al., 2004, 2006; Yoshiuchi et al., 2008). Предполага се, че ER стрес, резултат от липотоксичност на свободните ВМК, повлиява енергийния метаболизъм в хипоталамуса, което може да е в основата на развитие на лептинова и инсулинова резистентност, затлъстяване и метаболитен синдром (Martínez de Morentin et al., 2009). Активирането на UPR стимулира JNK1, в резултат се фосфорилира серин 307 в IRS-1, което нарушава инсулиновата сигнализация (Ozcan et al., 2004). При стимулиран ER стрес IKK се активира, което отключва NF-κB и впоследствие-продукцията на проинфламаторни цитокини. ER стресът може да се активира от високи нива на свободни ВМК, излишък от нутриенти, неправилно нагънати протеини и локална хипоксия, която е характерна при затлъстяване. При това състояние в черен дроб и мастна тъкан на затлъстели животни маркерите на оксидативния стрес се индуцират (Yoshiuchi et al., 2008).

Интересен наблюдаван факт е връзката между активираната експресия на aP2 в макрофаги и асоциацията му с развитието на ER стрес и възпаление (Furuhashi et al., 2008). В съответствие и с направените по-рано анализи потискането на aP2 в макрофаги предпазва клетките от ВМК индуцирания при затлъстяване възпалителен процес, което се изразява в повишена инсулинова чувствителност и глюкозен толеранс (Furuhashi et al., 2008). Способността на екстракта да инхибира LPS индуцираната транскрипция на aP2 е ефект, предполагащ, че екстрактът би имал протективно действие при състояния, свързани с развитие на ER стрес.

Знаем, че свободните ВМК и глюкозата активират PERK медираното фосфорилиране и активиране на еукариотния транскрипционен фактор eIF2α, както и РНК сплайсинга на Xbp-1 в плъщи адипоцити при модел на индуцирано затлъстяване и биопсии от хора (Boden et al., 2008; Sharma et al., 2008). CHOP (C/EBP homologous protein) е транскрипционен фактор от семейството на C/EBP протеините (Oyadomari and Mori, 2004; Ron and Habener, 1992) и е известно, че инхибира адипоцитната диференциация в отговор на метаболитен стрес (Tang and Lane, 2000). Генната експресия на CHOP се индуцира с предимство от PERK/eIF2α/ATF4 сигналната каскада, свързана с ER стрес, както и от IRE1α/Xbp-1 сигналния път и ATF6α транскрипционния фактор при патологични състояния, сред които и диабет (Eizirik et al., 2008; Lin et al., 2008; Ron and Hubbard, 2008; Ron and Walter, 2007).

Индуцирането на СНОР е свързано с активирането на апоптоза и увреждане на ДНК. Същият се индуцира в макрофаги при хора и животни и е отговорен за отлепването на атеросклеротичните плаки при атеросклероза (Tsukano et al., 2010). При Western blot анализа бе отчетено значително повишение в транслационните нива на транскрипционните фактори, индуциращи експресията на СНОР, а именно ATF6 α и p ϵ IF2 α в условия на LPS индуцирано възпаление (фиг. 41 и 42). Това бе последвано логично и от повишени нива на СНОР. Водният екстракт сам по себе си инхибира статистически значимо белтъчната синтеза на СНОР и p ϵ IF2 α . Понижаването на нивата на ATF6 α и фосфорилирането на eIF2 α в условия на индуцирано възпаление дава информация за механизма, чрез който екстрактът потиска синтезата на СНОР. Този вероятен механизъм на цитопротективно действие в условия на ER стрес се потвърждава и от корелацията между белтъчните нива на СНОР и отговорните за продуцирането му транскрипционни фактори (фиг. 44). Тези резултати за първи път потвърждават, че екстрактът, потискайки активирането на ER стрес може да потисне индуцираното възпаление при затлъстяване и инсулинова резистентност.



Фиг. 44 Зависимост между белтъчните нива на СНОР и отговорните за продуцирането му транскрипционни фактори (ATF6 α и p ϵ IF2 α) при J774A.1 макрофаги в модел на LPS индуцирано възпаление.

Посочените до момента факти дават основание да се твърди, че доказаното антиоксидантно, противовъзпалително и цитопротективно действия на плодовете от бъзак са реална предпоставка за потенциала му в превенцията и терапията на патологични състояния, свързани с развитието на възпаление, ER стрес и инсулинова резистентност. Такива състояния са затлъстяването, развитието на диабет тип 2, метаболитен синдром и съпътстващите ги ССЗ.

4.4. Изследване на влиянието на чай от плодове на *Sambucus ebulus* върху антропометрични и биохимични показатели, параметри на оксидативен стрес и ТАС в серуми от здрави доброволци

За да бъде анализирано действието на билков екстракт от плодове на бъзак *in vivo* бе проведено изследване с участието на 21 здрави доброволци на възраст от 20 до 58 години, сред които 15 жени и 6 мъже. При одобрението на Комисията по етика към Медицински Университет “Проф. Д-р Параскев Стоянов”, град Варна (протокол №18/08.03.2012), в съответствие с Декларацията на Хелзинкия комитет от 1964г. Всички доброволци в продължение на 30 дни, консумираха като допълнение към ежедневната им диета 200ml воден извлек (чай) от плодове на бъзак. Рецептата за приготвянето на чая бе според упътванията на производителя, описано в раздел материали и методи точка 4.2.2. Изследването целеше да бъде отчетен ефектът от консумация на екстракт от плодове на бъзак, богат на полифеноли, сред които не малка част антоцианини.

В таблица 3 са представени съдържанието на полифеноли и антоцианини в чая от бъзак, както и съответният дневен прием, на доброволците по време на изследването.

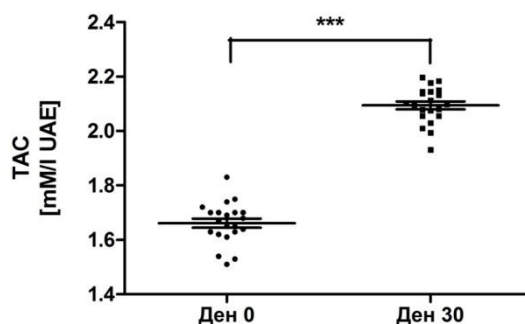
Таблица 3. Съдържание на тотални полифеноли и тотални антоцианини в чая от плодове на бъзак, консумиран от доброволците при проведеното изследване.

	Концентрация	Съдържание (mg/g сухо тегло)	Дневен прием (mg/ден)
Тотални полифеноли	0.75±0.02 mM QE	23.57±0.6	45.32±1.15
Тотални антоцианини	18.31±0.07 mg/L CGE	1.9±0.01	3.66±0.01

Представени са средните стойности за всеки един параметър ±SEM. QE – кверцетинови еквиваленти, CGE – цианидин-3-глюкозидни еквиваленти.

4.4.1. Влияние на воден извлек от плодове на *Sambucus ebulus* върху маркери на антиоксидантния капацитет при здрави доброволци

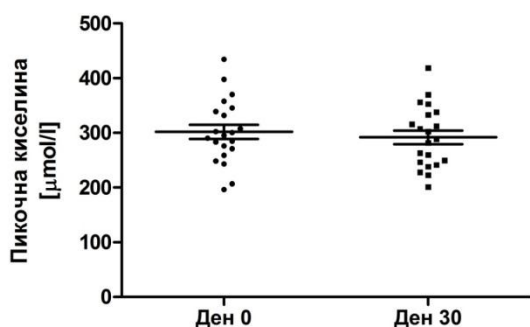
На фигура 45 са представени резултатите от измерването на TAC на серуми от здрави доброволци преди и в края на изследването. При всеки един участник стойностите, измерени в началото на периода на суплементация, бяха приети за контролни спрямо тези, получени в края на изследването. Този принцип бе приложен при анализирането на измененията за всеки един изследван показател.



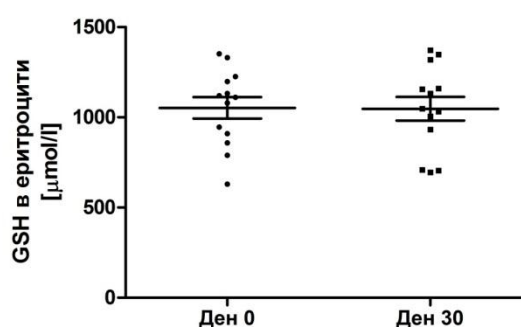
Фиг. 45. Изменение на TAC на серуми от здрави доброволци след 30 дневна консумация на чай от бъзак. *** $p < 0.001$, спрямо базовите стойности. Представени са средните стойности преди (ден 0) и в края (ден 30) на изследването ± SEM.

В края на периода на изследването бе установено силно статистически значимо ($p < 0.0001$) повишаване в TAC с около 20% спрямо ден 0.

Освен TAC, бяха измерени серумните нива също и на пикочна киселина (ПК) и GSH в лизати от еритроцити: ПК като едно от основните съединения в кръвта което определя TAC, докато GSH като основен вътреклетъчен антиоксидант, от особено значение за еритроцити.



Фиг. 46 Изменение в концентрацията на пикочна киселина в серуми на здрави доброволци след 30 дневна консумация на чай от бъзак.

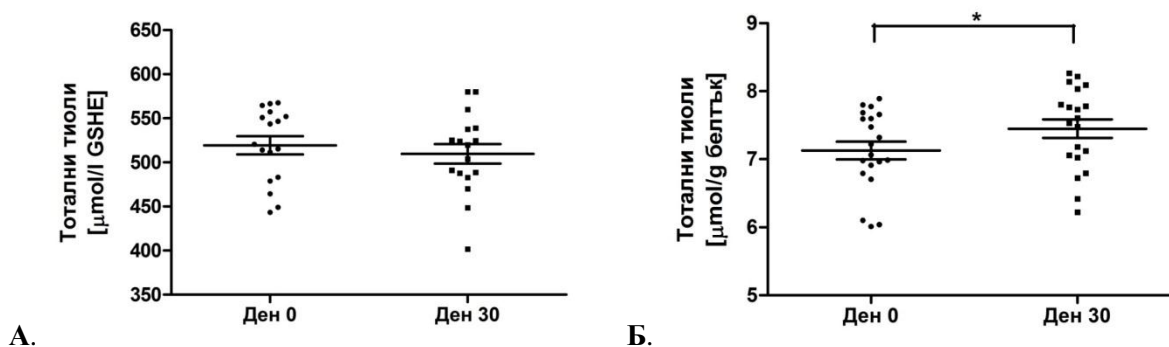


Фиг. 47 Изменение в концентрацията на глутатион (GSH) в еритроцити от здрави доброволци след 30 дневна консумация на чай от бъзак.

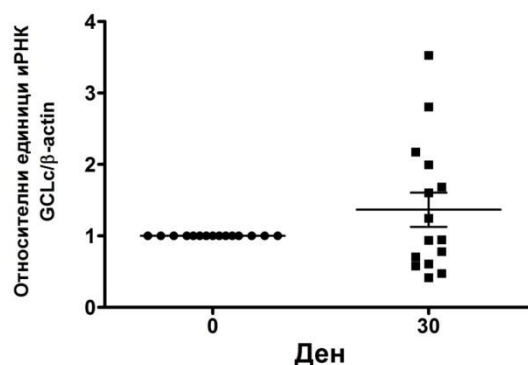
Представени са средните стойности преди (ден 0) и в края (ден 30) на изследването ± SEM.

При настоящото изследване не бяха отчетени статистически значими изменения в стойностите, както на ПК в серум (фиг. 46), така и на GSH в лизати от еритроцити (фиг. 47).

Глутатионът, наред с други плазмени белтъци, съдържащи SH-групи се очаква да има съществен дял в неутрализирането на *in vitro* генерирания ABTS⁺ катион радикал при анализа на ТАС по метода на Re et al. (1999). Във връзка с това бяха измерени и нивата на ТТ в серум, в началото и в края на интервенцията (фиг. 48, А и Б).



Фиг. 48 Изменение в концентрацията на ТТ в серуми на здрави доброволци след 30 дневна консумация на чай от бъзак. А – стойности на ТТ представени като $\mu\text{mol/l}$ еквиваленти глутатион (GSHE), Б – стойности на ТТ представени като $\mu\text{mol/g}$ белтък. $*p < 0.05$, спрямо базовите стойности. Представени са средните стойности преди (ден 0) и в края (ден 30) на изследването \pm SEM.



Фиг. 49 Изменение в транскрипционните нива на ензима GCLC в buffy coat от цяла кръв на здрави доброволци след 30 дневна консумация на чай от бъзак. Представени са средните стойности преди (ден 0) и в края (ден 30) на изследването \pm SEM.

При доброволците бе наблюдавана лека тенденция на индукция в експресията на ензима от синтезата на глутатион (фиг 49). Това позволява да се спекулира, че отчасти това би било причина за повишените нива на тоталните тиоли/g белтък.

Обсъждане

Изследванията при клетъчни култури показаха, че екстрактът, индуцирайки експресията на NF-κB транскрипционния фактор, индуцира експресията на GCLC при макрофаги и преадипоцити. Поради ограничения брой участници е трудно установяването на статистическо изменение в нивата на генната експресия на ензима. Въпреки това в края на интервенцията се забелязва лека тенденция на индукция при групата като цяло.

Получените стойности в измерените нива на ТТ в края на изследването бяха в по-широк диапазон, за разлика от базовите нива в началото. Според първоначално изчислените средни стойности и съответните отклонения на ТТ в групата не бе отчетено статистически значимо изменение в концентрацията им, (фиг. 48, А). Изчисляване на концентрацията на ТТ като част от

количеството общ белтък в плазма показва статистическо значимо повишение на тиоловите белтъци (фиг. 48, Б), маркер за повишен редуциращ/антиоксидантен капацитет.

Много експериментални доказателства потвърждават факта, че високите нива на окислен LDL са свързани с развитието на атеросклероза и една от основните роли в превенцията на това заболяване играят антиоксидантите, в т.ч. водно и мастно разтворими витамини, полифенолите и други съединения със способност да свързват и обезвреждат свободни радикали (Manson et al., 1993; Hoffman et al., 1995; Diaz et al., 1997; Enstrom et al., 1992; Matuschek et al., 2002). Полифенолите със своята пряка АОА имат способността да предотвратят окислението на липопротеиновите комплекси с ниска плътност и така да подобряват състоянието на съдовия ендотел, осигурявайки превенция срещу развитието на атеросклероза и ССЗ (Serafini et al., 2000).

ПК е краен метаболит от катаболизма на пуриновите нуклеотиди в клетките (Косекова и съавт. 2010). Научни изследвания още от преди години описват ролята ѝ като антиоксидант (Ames et al., 1981; Sevanian et al., 1985) и както положителната, така и отрицателната ѝ връзка с развитието на ССЗ (Freedman et al., 1995; Bengtsson et al., 1988; а, б Iribarren et al., 1996). При някои патологични състояния тя може да се приеме и като маркер за оксидативен стрес (Becker, 1993). Известно е, че самата тя може да проявява и антиоксидантни свойства (Glantzounis et al., 2005) и в някои методи за определянето на АОА на екстракти например се използва като стандарт (Re et al., 1999). Както аскорбиновата киселина, така и пикочната киселина са силни редуциращи агенти (донори на електрони) и съответно-потенциални антиоксиданти. Повече от половината от ТАС на кръвта се дължи именно на пикочната киселина (Maxwell et al., 1997). Въпреки последните факти, стойностите на концентрация за пикочната киселина останаха почти непроменени в края на настоящото изследване (фиг. 46). Запазването на постоянни стойности на ПК може да се приеме като потвърждение за това, че АОА на екстракта от плодове на бъзак е всъщност вероятната причина за засилване на ТАС на серум в края на интервенцията.

Еритроцитите като клетки, изключително чувствителни на оксидативен стрес, използват GSH и глутатионовата антиоксидантна система като основен вътреклетъчен защитен механизъм за обезвреждането на липидни пероксиди и H_2O_2 (Янкова Т. и съавт. 2004). Повишените нива на GSH се асоциират с повишена способност да се обезвреждат свободни радикали и техни производни. В присъствие на оксидативен стрес е доказано, че нивата му се повишават. Те могат да се индуцират и в присъствието на съединения като флавоноидите, които активират експресията на гени, свързани с *de novo* синтеза на GSH, такива като GCL например (Myhrstad et al., 2002). За феноли като галовата киселина има данни, че индуцира промяна в съотношението на вътреклетъчния GSH/GSSG баланс при B16 меланомна клетъчна линия в полза на GSH (Kim, 2007). Може да се предположи, че екстракт богат на полифеноли и антоцианини ще повлияе нивата на вътреклетъчния GSH, което бе проверено с анализирането на нивата му в еритроцити (фиг. 48).

Тоталните тиоли (ТТ) са широко използван маркер за изменения в редокс баланса в организма. При наличие на свободни радикали много от белтъците с достъпни SH-групи биха се окислили, в т.ч. и GSH като един от основните сулфо-хидрилни белтъци. Следователно, понижения в нивата на ТТ биха могли да бъдат тълкувани като понижен редуциращ капацитет/свидетелство за оксидативен стрес, докато за повишението им може да се спекулира, че предполага повишен редуциращ капацитет/ТАС на серум. Ето защо бе интересно да се отчете влиянието на екстракта върху концентрацията на ТТ в серуми на участниците. Освен това, експериментите, проведени върху клетъчни култури, показаха, че водният екстракт от бъзак индуцира експресията на GCLc, което предполага повишение в нивата на *de novo* синтезираният GSH. Повишените нива на ТТ като част общия белтък биха могли да обяснят от части и повишения ТАС на серум, след 30-дневна консумация на чай от бъзак.

Независимо, че водният екстракт от плодовете на билката индуцира експресията на ключовият ензим (GCLc) от синтеза на GSH при 3T3-L1 преадипоцитни и J774A.1 макрофажни клетки, нивата на GSH в еритроцити не се промениха. Съществуват научни доказателства за това, че диета богата на флавоноиди и антоцианини индуцира експресията на GCL в мускулна тъкан при мишки (Carlsen H. et al., 2003), без този ефект, да се изрази в увеличение на глутатионовите нива във всички видове мускулна тъкан. Други автори също не установяват промяна в нивата на GSH, въпреки индуциране на експресията на ензима GCL при гризачи, третирани с богат на полифеноли растителен екстракт (Shepherd A. G. et al., 2000). Следователно, можем да предположим че има други механизми, по които се регулира концентрацията му в различните тъкани. Би било интересно да се проследи изменението в експресията на глутатион редуктазата, за

да се получи по-пълна картина за изменението в метаболизма на GSH при консумацията на чай богат на полифеноли и антоцианини.

Консумацията на ягоди, спанак и червено вино, които също са богати на антиоксидантни фенолни съединения, повишават ТАС при хора (Cao et al., 1998). Доказано е, че при плъхове фенолните съединения от плодовете на растения се абсорбират в интактна форма (Tsuda et al., 1999; a, Youdim et al., 2000). В друго изследване, което описва биодостъпността на антоцианите от плодове на бъз (*Sambucus nigra*), друг представител от рода (a, Youdim et al., 2000), се посочва високата степен на инкорпориране на антоцианини от ендотелните клетки и основно в клетъчните мембрани. Високата степен на абсорбиране на антоцианини от ендотелните клетки предполага значителна степен на защита в условия на оксидативен стрес. При суплементиране на плъхове с екстракт от боровинки богат на полифеноли се установява засилване на АО защитни механизми и устойчивостта им на действието на свободни радикали (б, Youdim et al., 2000). От наличните полифеноли в екстракта само за антоцианините е доказано, че индуцират в значителна степен свободно-радикаловата устойчивост на еритроцитите 6 и 24 часа след суплементация (Milbury et al., 2002). Трябва да се отбележи, че ефектът на антоцианините върху АО защитни механизми при еритроцитите не корелира и не е свързан със съдържанието им в плазма. Дори съдържанието на полифеноли е най-високо един час след суплементация, докато на шестия час намаляват значително и съвсем не се откриват на 24-ия час (Milbury et al., 2002).

Общото количество от растителни феноли, които могат да се абсорбират от човек, са около 1g/dl (Scalbert, A. & Williamson, G. 2000). Присъствието им в диетата може да бъде от важно значение за засилване на ТАС на организма и за превенцията на патологични състояния, съпроводени с оксидативен стрес.

4.4.2. Изследване на ефекта на воден извлек от плодове на *Sambucus ebulus* върху антропометрични показатели на здрави доброволци

Демографските данни, както и изменението в антропометричните параметри за периода на изследването на групата от здрави доброволци са представени в таблица 4. Бяха измерени тегло, индекс на телената маса (ИТМ), съотношение талия/ханш и кръвно налягане (систолично и диастолично). В края на изследването не бяха отчетени статистически значими изменения за нито един от посочените параметри, въпреки наблюдаваното 5% понижение в систоличното кръвно налягане.

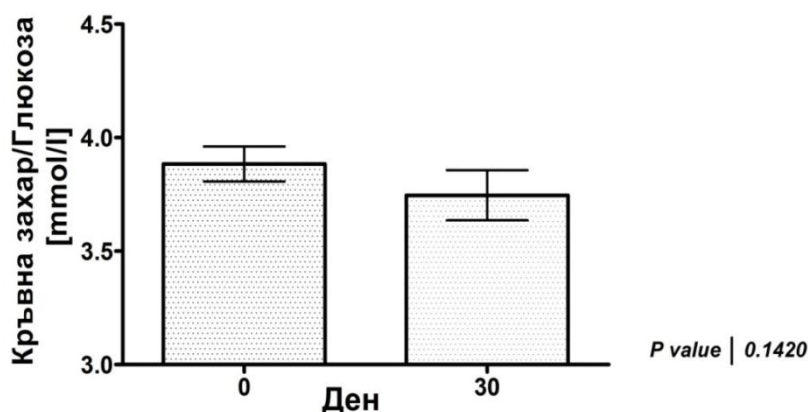
Таблица 4. Антропометрични измервания и демографски данни на изследваните доброволци.

	Ден 0	Ден 30	Изменение [%]
Пол (мъж/жена)	6/15		
Възраст (години)	25.19 ± 10.71*		
Ръст (m)	1.68 ± 0.07*		
Тегло (kg)	65.22 ± 4.13	64.68 ± 4.07	-0.83
ИТМ (kg/m ²)	23.12 ± 1.31	22.93 ± 1.29	-0.83
Талия/Ханш	0.78 ± 0.01	0.81 ± 0.03	3.77
Кръвно налягане - систолично (mmHg)	109.57 ± 3.99	107.86 ± 2.84	-1.56
Кръвно налягане - диастолично (mmHg)	72.95 ± 2.62	69.29 ± 2.40	-5.03

ИТМ (индекс на телесната маса). Представени са средните стойности преди (ден 0) и в края (ден 30) на изследването ±SD (*), ±SEM.

4.4.3. Изследване на ефекта на воден извлек от плодове на *Sambucus ebulus* върху някои биохимични показатели и експресията на избрани гени при здрави доброволци като маркери за АОА, възпаление и липиден метаболизъм

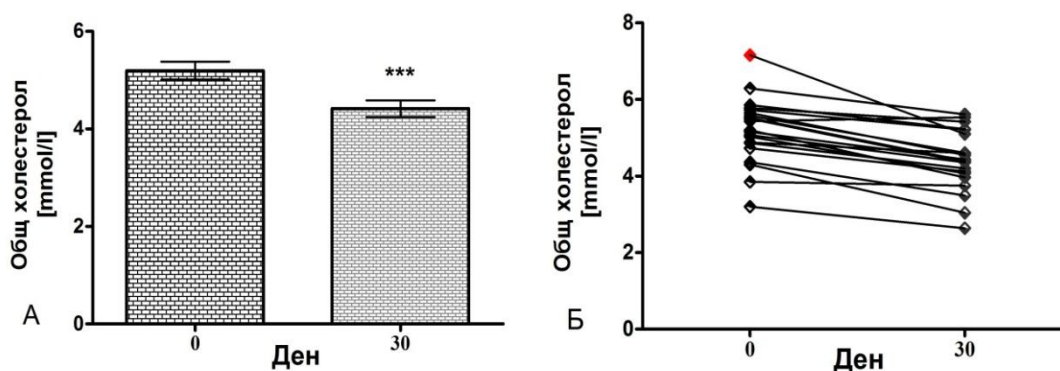
Резултатите от измерването на нивата на кръвна захар в началото и в края на изследването са представени на фигура 50.



Фиг. 50. Изменение в стойностите на кръвна захар при здрави доброволци след консумация на чай от плодове на бъзак. Представени са средните стойности и диапазона, който обхващат концентрациите на глюкоза в серуми в 0 и 30 ден от изследването. Приложен е *t*-test за отчитане на разликата в средните стойности на двете измервания $p=0.142$. Представени са средните стойности за всеки един параметър в началото (ден 0) и в края (ден 30) на изследването \pm SEM.

Средната стойност на кръвната захар в началото на изследването бе 3.91 mmol/l. След периода на суплементация беше определена средна стойност на кръвната захар за цялата група участници от 3.75 mmol/l. Отчетеното понижение в стойностите на показателя не са статистически значими, предвид малкият брой (21) на относително хомогенната група участници ($p=0.142$) поради което е трудно да се отчете хипогликемичен потенциал на водният екстракт от плодове на бъзак.

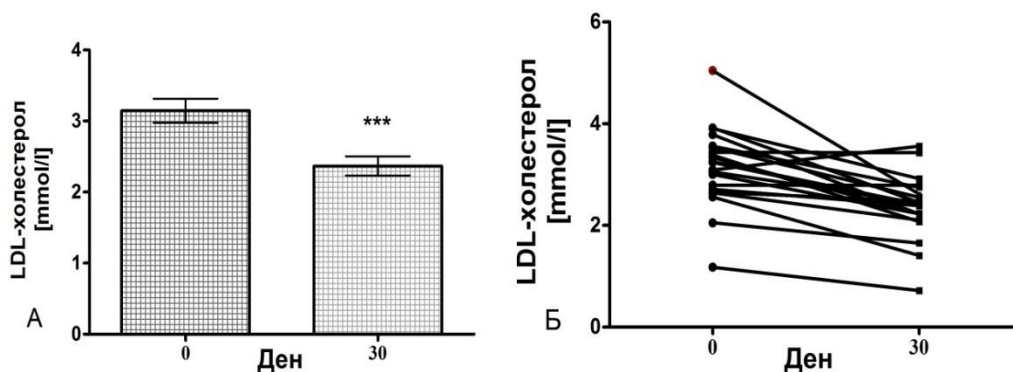
Представените резултати по отношение на влиянието на екстракта върху общия холестерол при здрави доброволци (фиг. 51) разкриха добър хипохолестеролемичен ефект ($p<0.0001$).



Фиг. 51 Изменение в стойностите на общ холестерол в серум от здрави доброволци в 0 и в 30 ден от изследването. **А.** Изменение в средните стойности за общ холестерол на групата участници в началото и в края на изследването; **Б** Изменение в стойностите на общ холестерол за всеки един от участниците. Приложен е *t*-test за отчитане на разликата в средните стойности на двете измервания $***p<0.001$. Представени са средните стойности за всеки един параметър в началото и в края на изследването \pm SEM.

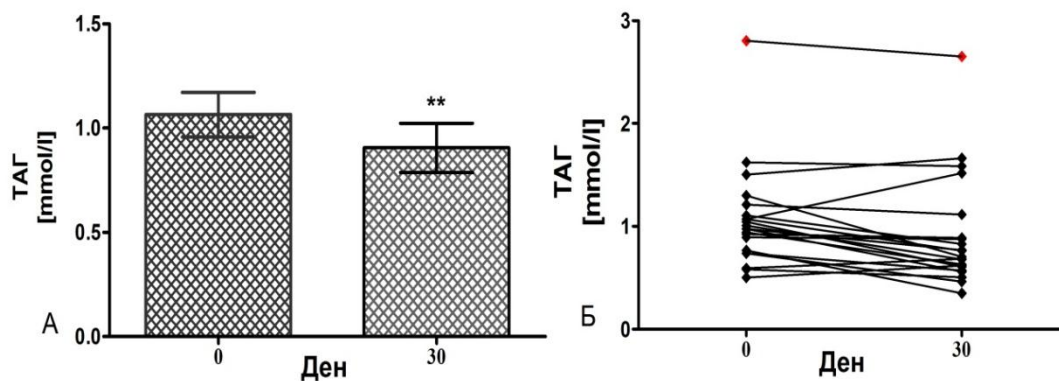
Средната концентрация на общият холестерол преди суплементацията с билковия екстракт бе 5.22 mmol/l, докато след това тя се понижи до нива от 4.41 mmol/l.

В края на изследването бе установено също и това, че консумацията на чай от плодове на бязак, заедно с понижаване на общият холестерол води до редуциране и на LDL-холестерола (фигура 52, А и Б), при това с висока статистическа значимост ($p < 0.0001$). В края на изследвания период средните нива на LDL-холестерола бяха понижени от 2.78 mmol/l до 2.43 mmol/l.



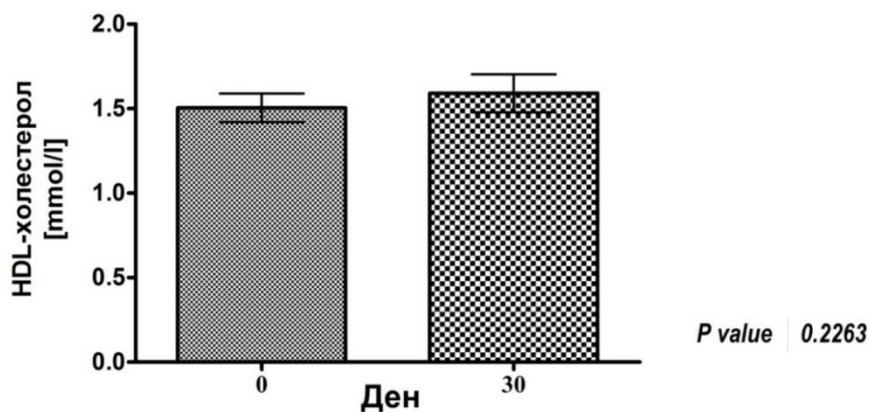
Фиг. 52. Изменение в стойностите на LDL-холестерол в серум от здрави доброволци в 0 и в 30 ден от изследването. **А.** Изменение в средните стойности за общ холестерол на групата участници в началото и в края на изследването; **Б** Изменение в стойностите на LDL-холестерол за всеки един от участниците. Приложен е *t*-test за отчитане на разликата в средните стойности на двете измервания $***p < 0.001$. Представени са средните стойности за всеки един параметър в началото и в края на изследването $\pm SEM$.

Този ефект бе установен и при ТАГ (фиг. 53, А и Б). Разликата в средните стойности на показателя в началото и в края на интервенцията бе отчетлива ($p < 0.01$).



Фиг. 53. Изменение в стойностите на ТАГ в серум от здрави доброволци в 0 и в 30 ден от изследването. **А.** Представени за средните стойности за ТАГ на групата участници в началото и в края на изследването; **Б.** Изменение в стойностите на ТАГ за всеки един от участниците. Приложен е *t*-test за отчитане на разликата в средните стойности на двете измервания $**p < 0.01$. Представени са средните стойности за всеки един параметър в началото и в края на изследването $\pm SEM$.

Положителните изменения в липидният профил бяха наблюдавани и под формата на повишението в нивата на HDL-холестерола (фиг. 54).



Фиг. 54. Изменение в стойностите на HDL-холестерол в серум от здрави доброволци в 0 и в 30 ден от изследването. Представени за средните стойности за HDL-холестерол на групата участници в началото и в края на изследването. Приложен е *t*-test за отчитане на разликата в средните стойности на двете измервания $p=0.2263$. Представени са средните стойности за всеки един параметър в началото и в края на изследването \pm SEM.

Средните нива на HDL-холестерола за групата се повишиха от 1.5 mmol/l до 1.6 mmol/l. При препоръчителни нива на HDL-холестерола за мъже над 1.42 mmol/l, а за жени над 1.68 mmol/l. Средната стойност на резултатите е получена от стойностите за HDL-холестерола на всички участници от които близо 30% бяха мъже.

Въпреки, че нивата на ХДЛ-холестерола не се повишиха статистически значимо, то съотношението HDL/LDL-холестерол в края на изследването нарастна с 42.77% (от 0.54 до 0.77 в края на изследването) ($p<0.01$).

Установена бе интересна промяна в стойностите на един от участниците, чийто нива на общ холестерол (7.16 mmol/l) (фиг. 51 Б), LDL-холестерол (4.67 mmol/l) (фиг. 52 Б) и ТАГ (2.8 mmol/l) (фиг. 53, Б) в началото на изследването бяха над нормалните, а в края на изследването общият (5.1 mmol/l) и LDL-холестеролът (3.17 mmol/l) се бяха понижали до стойности, на нормата, а концентрацията на ТАГ (2.65 mmol/l) бе също понижена, но остана по-висока от референтните стойности.

Индексът на телесната маса (ИТМ) като показател за диагностициране на състояние на затлъстяване или недохранване е представен в таблица 5, съответно: референтните граници за ИТМ, определени от СЗО през 1995 (5, А) и средна стойност на ИТМ в изследваната група в началото и в края на интервенцията (5, Б).

Таблица 5. А. Референтни стойности на ИТМ, определени от СЗО през 1995г. Б. Средна стойност на ИТМ при групата от участници в 0 и 30 ден от изследването \pm SEM.

А.

Състояние	ИТМ [kg/m ²]
Поднормено тегло	<18.5
Нормално тегло	18.5-24.99
Наднормено тегло	≥ 25
Затлъстяване тегло	≥ 30

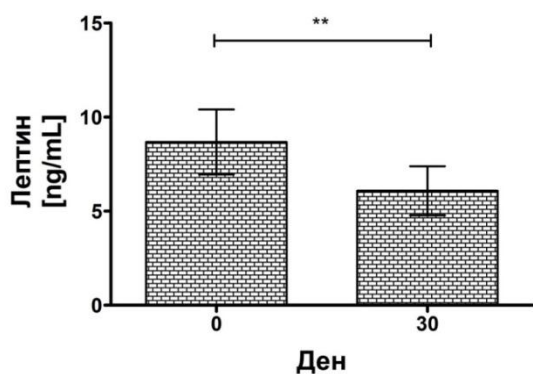
Б.

	ИТМ [kg/m ²]
0 ден	23.03 \pm 1.28
30ден	22.93 \pm 1.29

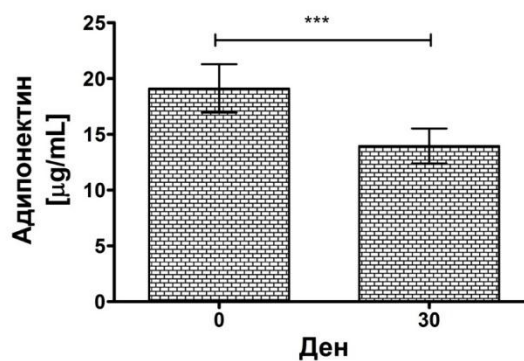
В края на изследването беше установено леко понижение в стойността на ИТМ (табл. 5, Б), но то не беше статистически значимо ($p=0.1589$). Наблюдаваният ефект или по-точно липсата на такъв по отношение на ИТМ се припокрива с резултатите, получени от подобно изследване с

участие на хора, при което консумацията на сок от боровинки, богат на антоцианини, флавоноли, фенолни киселини и др. също не повлиява статистически значимо ИТМ (Karlsen A. et al., 2010).

Изследване на адипокини в серумите от доброволци показва, че едномесечна консумация на чай от плодове на бъзак значимо понижава и нивата на лептин (фиг. 55) ($p < 0,01$) и тези на адипонектин (фиг. 56) ($p < 0,001$). За същия период, също така нивата на цитокините IL-1 β (фиг. 57) и CRP (фиг. 58) ($p < 0,05$) значимо се понижиха и бе наблюдавана тенденция на понижение в нивата на IL-6 и TNF α .

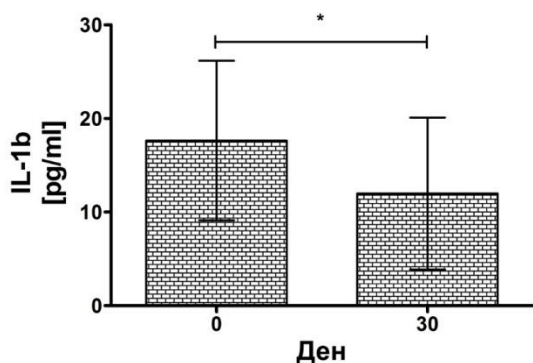


Фиг. 55 Изменение в концентрацията на лептин в серуми от здрави доброволци след 30 дневна консумация на чай от бъзак.

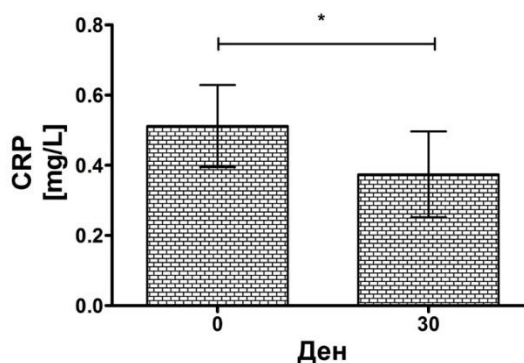


Фиг. 56 Изменение в концентрацията на адипонектин в серуми от здрави доброволци след 30 дневна консумация на чай от бъзак. спрямо базовите стойности

$**p < 0.01$, $***p < 0.001$ спрямо базовите стойности. Представени са средните стойности преди (ден 0) и в края (ден 30) на изследването \pm SEM.



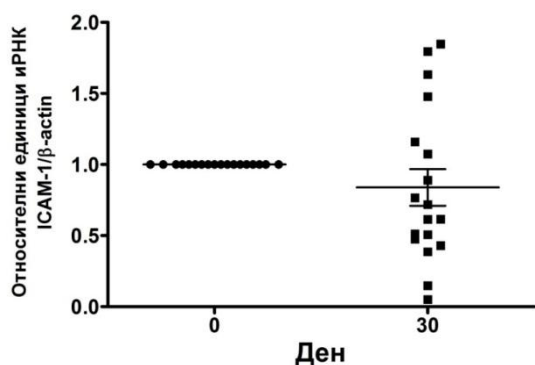
Фиг. 57 Изменение в концентрацията на IL-1 β в серуми от здрави доброволци след 30 дневна консумация на чай от бъзак.



Фиг. 58 Изменение в концентрацията на CRP в серуми от здрави доброволци след 30 дневна консумация на чай от бъзак.

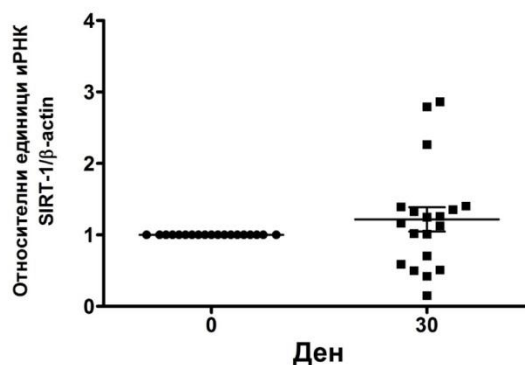
$*p < 0.05$ спрямо базовите стойности. Представени са средните стойности преди (ден 0) и в края (ден 30) на изследването \pm SEM.

В резултат от едномесечна консумация на чай от бъзак бе отчетена промяна в в генната експресия на IL-6, за разлика от това се наблюдава тенденция на понижение на ICAM-1 (фиг. 59) и на повишение на SIRT-1 (фиг. 60) при мононуклеарни клетки от кръв на доброволци, подобно на ефекта, отчетен при анализа на генната експресия на същите в клетъчни култури.



Фиг. 59 Изменение в транскрипционните нива на белтъка ICAM-1 в лимфоцити и тромбоцити, изолирани от цяла кръв на здрави доброволци след 30 дневна консумация на чай от бъзак.

Представени са средните стойности преди (ден 0) и в края (ден 30) на изследването \pm SEM.



Фиг. 60 Изменение в транскрипционните нива на ензима SIRT-1 в лимфоцити и тромбоцити, изолирани от цяла кръв на здрави доброволци след 30 дневна консумация на чай от бъзак.

Обсъждане

Високите нива на кръвна захар са свързани с развитието на заболявания като диабет тип две, затлъстяване, метаболитен синдром и други. развитието на тези заболявания се съпровожда с продукцията на АКФ и развитието на оксидативен стрес, както и с развитието на хронично нискостепенно възпаление в мастната тъкан, панкреас и други тъкани. Съединения с антихипергликемичен ефект, антиоксидантно и противовъзпалително действие биха били от полза при превецията и/или лечението на тези социално-значими заболявания.

Диабетът е заболяване, което се характеризира с повишени нива на кръвна захар/глюкоза в организма. Това се дължи на нарушения във въглехидратния метаболизъм и е свързано основно с нарушена синтеза на инсулин или отслабена чувствителност на прицелните тъкани към него (Maiti et al., 2004; Rother, 2007). Инсулинът е хормон, който се секретира от панкреаса и стимулира абсорбцията на глюкоза от клетките и трансформацията ѝ в енергия, необходима за функционирането им. При нарушена абсорбция на глюкоза се стига до състояние на хипергликемия, което води до усложнения в сърдечно-съдовата, нервната и други системи (Tierney et al., 2002). Това заболяване е сред най-разпространените и социално-значими заболявания на нашето съвремие, засягащо близо 25% от населението на Земята. развитието на диабет тип 2, при който се намалява или напълно отсъства чувствителност на инсулиновите рецептори, е едно от условията, които предразполагат за развитието на ССЗ (Jones, 2008). При пациенти, страдащи от диабет, нивата на ТАГ в плазма са увеличени, докато концентрацията на HDL-холестерола е намалена в сравнение със здрави хора (Magliano et al., 2008). Тип-1 диабетът обхваща около 10% от страдащите от това заболяване (Urger and Foster, 1998). Ефективно лечение на това заболяване в момента липсва и най-разпространеният начин при тип-1 инсулин-зависимия диабет е терапията с инсулин. Но не липсват данни за развитието на инсулинова резистентност и мастен черен дроб при продължителна инсулинова терапия (Yagura-Tobias et al., 2001). Във връзка с това е постоянен интересът към търсенето на лек за това и други заболявания в природните средства, използвани от народната медицина. Изследвания на някои от тези растения разкриха токсичното им действие при експерименти с животни (Acuna et al., 2002; Lee et al., 2002). Ето защо търсенето на по-ефективни и безопасни лекарствени растения с противодабетно, антиоксидантно и антиобезитно действие е от изключителна важност.

Изследванията, направени върху водния екстракт от бъзак при настоящото научно изследване, доказаха високата му АОА, както в условия *in vitro*, така и в *in vivo* условия, при което ТАС в серуми от здрави доброволци се повиши с около 20%. Тези резултати, подкрепени от наличните до този момент в литературата данни за състава на различни екстракти от *S. Ebulus*, като например хлорогенна киселина (a, Yesilada, 1997), иридоидни гликозиди (Pieri et al., 2009), антоцианини, пектин и витамин С (Стойчева, 1986) и др. Високото съдържание на полифеноли, от които близо 25-30% антоцианини в билковия екстракт, предполагат неговата АОА.

Едни от действията, приписвани на полифенолите са хиполипидемична, хипогликемична, хипохолестеролемична (Nahm et al., 2011; Mollace et al., 2011), антиоксидантна и противовъзпалителна активност (Castilla et al., 2006). Имайки предвид състава на водния екстракт от бязак, можем да предположим подобен ефект и за него.

Подобно на други екстракти с доказана АОА и хипогликемично действие, така и екстрактът от плодове на бязак показва способност да понижи нивата на кръвна захар. Това значимо изменение в стойностите на този параметър, макар и при малкия брой на участниците в изследването, предполага добра хипогликемична и антихипергликемична активност на билката. Можем да предположим, че наблюдаваният ефект се дължи на опосредствано от полифеноли активиране на сигнални каскади, регулиращи експресията и/или активността на ензими от въглехидратния механизъм. Проучването на вероятните механизми, чрез които се повлиява въглехидратният механизъм под действие на екстракта, биха били интересна тема за по-нататъшни научни изследвания. Изследването на ефекта върху чувствителността на инсулиновите рецептори, нивата на експресия на гени, свързани с инсулиновата продукция и чувствителност могат да бъдат едно много добро продължение за изясняването на антихипергликемичното и противодиабетно действие не само на плодовете, а и на други части от растението, прилагани в народната медицина. Развитието на възпалителни процеси в панкреаса, развитието на хронично възпаление при затлъстяване (Pickup, 2004) също могат да бъдат причина за появата на диабет и евентуални компоненти в екстракта с противовъзпалителна активност като урсоловата киселина например (Schwaiger et al., 2011; Subbaramaiah et al., 2000) биха имали потенциал за превантивно действие. Не са малко експериментите върху животни и клетъчни култури, анализиращи противовъзпалителното действие на различни видове екстракти от различни части на растението, както при хронично, така и при остро възпаление (a, Yesilada et al., 1997; Besemer et al., 2005; Ebrahimzadeh et al., 2007; Schwaiger et al., 2011). Възпалението е един от факторите, свързани със затлъстяването, които водят до развитието на инсулинова резистентност на мускулната, мастна и чернодробна тъкан. Доказано е при животни и хора, че агенти с противовъзпалително действие могат да предпазят от развитие на диабет, индуциран от определен тип диета (Schenk et al., 2008; Wellen et al., 2005). Нивото на макрофаги е представено в много по-високо количество в мастна тъкан при хора със затлъстяване, отколкото при такива с нормална телесна маса, което е условие за повишаване на нивата на провъзпалителните цитокини, свързани с развитието на инсулинова резистентност като например TNF α и IL6 (Wellen et al., 2005; Heilbronn et al., 2008; Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003).

Както бе дискутирано по-рано, при развитието на инсулинова резистентност и в последствие диабет тип 2, е характерно развитието на състояние наречено "метаболитен синдром". В него се включват проявите на инсулинова резистентност, хиперинсулинемия, дислипидемия, обикновено свързана с повишени нива на ТАГ и понижен HDL-холестерол в плазма (Schenk et al., 2008). Независимо от развитието на диабет, метаболитният синдром може да доведе до патологични състояния като повишен риск от ССЗ (инфаркт, инсулт, високо кръвно налягане) (Reaven et al., 2005; Olefsky et al., 2005; Facchini et al., 2001).

Хиперлипидемия или хиперхолестеролемия е основната предпоставка за развитието на атеросклероза и ССЗ (Baigent et al., 2005; Gielen et al., 2009). Конкретните параметри на кръвният серум, които са свързани с развитието на тези патологични състояния са повишените концентрации на триглицериди, LDL-холестерол и повишен общ холестерол, както и понижени нива на холестерола, свързан в HDL-липопротеиновите комплекси. Инсулиновата резистентност при тип 2 диабет също може да доведе до повишен риск от ССЗ (Jones, 2008). Лекарствените средства, използвани при лечението на хиперхолестеролемия, са от групата на т.нар. статини, чиято роля е да инхибират активността на 3-хидроккси-3-метилглутарил-КоА редуктаза (ХМГ-КоА редуктаза). Този ензим е основният регулаторен ензим от метаболизма на холестерол и катализира регулаторната реакция от синтеза на холестерол, а именно получаването на мевалонат (Harvey et al., 2010). В резултат от действието на статините се понижават нивата на общия и LDL-холестерол. Въпреки многото положителни ефекти на статините (Baigent et al., 2005), много от пациентите с метаболитен синдром не достигат препоръчителните нива на HDL и LDL (Jones, 2008). При повече от 40% от хората, подлежащи на лечение със статини, тяхното приложение е забранено, основно поради страничните ефекти, включващи миалгия, миопатия или чернодробни заболявания и рабдомиолиза при по-тежките случаи (Alsheikh-Ali and Karas, 2009; Joy and Hegele, 2009). Подобни ограничения в употребата на тези лекарства още повече засилва необходимостта

от намиране на алтернативни терапевтични средства, каквито се явяват лечебните растения с множество благотворни въздействия при подобни и други заболявания.

При консумацията на билков екстракт от *Sambucus ebulus* се стига до значително понижаване нивата на ТАГ (фиг. 53), едновременно с това и на концентрациите на общия холестерол (фиг. 51) за сметка на понижените концентрации от LDL (фиг. 52). Това води до намаляване на риска от затлъстяване и развитието на свързаните с него усложнения. Наличните в билковия извлек полифенолни съединения най-вероятно са причината за антиатерогенното му действие, като в основата на този механизъм е заложена хиполипидемичната и антиоксидантна активност, която проявяват тези съединения (Devaraj et al., 2004; Dohadwala et al., 2009; Gorinstein et al., 2006). Анализирани поотделно хипохолестеролемичната активност на някои компоненти с растителен произход е по-слаба (Kurowska et al., 2004), докато комплекси от няколко растителни полифеноли проявяват по-добра хиполипемична активност (Devaraj et al., 2004; Gorinstein et al., 2006; Kurowska et al., 2004), което би предположило, че комбиниране на ефекта от различните биологично активни субстанции всъщност е основна причина за благотворното им действие.

Известно е, че храни, растителни екстракти богати на полифеноли, витамини и други съединения с известна АОА повлияват положително развитието на заболявания, свързани с оксидативният стрес и неговите ефекти върху жизнеността на клетките (World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, 1997; Willet, 1999; Harborne and Williams, 2000; Tapiero et al., 2002). Подобни съединения биха подпомогнали АО системи на клетките, като пряко влизат в реакции на обезвреждане на АКФ, активни азотни форми (ААФ), както и със способността си да активират експресията на ензими свързани с АО защита (Wilkinson and Clapper, 1997; Carlsen et al., 2003). Много експериментални доказателства потвърждават факта, че високите нива на окислен LDL са неминуемо свързани с развитието на атеросклероза и основна роля в превенцията на това заболяване играят антиоксидантите като витамини, полифеноли и други притежаващи способността да свързват и обезвреждат свободни радикали (Manson et al., 1993; Hoffman et al., 1995; Diaz et al., 1997; Enstrom et al., 1992; Matuschek et al., 2002). Доказано е наличието на антоцианини и витамин С в плодове от бязак (Стойчева, 1986), както и полифеноли, които като АО могат да предотвратят окислението на липопротеиновите комплекси с ниска плътност и така подобряват състоянието на съдовия ендотел и осигуряват превенция срещу развитието на атеросклероза и ССЗ (Serafini et al., 2000).

Екстрактът от бязак като богат източник на антиоксиданти, повишавайки ТАС на серума би довело до предотвратяване на окислението на липопротеиновите комплекси с ниска плътност и би потиснало развитието на атеросклеротични плаки.

При третирането на 3T3-L1 преадипоцитни клетки с екстракт доведе до повишена експресия на ензимите GCLc и GPx-4, което предполагаше че този ефект ще се изяви и в *in vivo* условия. Действително консумацията на чай от бязак доведе до значително повишен ТАС на серума при здрави доброволци. Съчетаването на експерименти върху миши клетъчни култури с изследвания върху хора е стъпка в посока по-задълбочено разкриване лечебния потенциал на билката.

Нивата на адипокините лептин (фиг. 55) и адипонектин (фиг. 56) в края на това изследване се понижиха. Повишени нива на адипонектин, се асоциират с повишение на инсулиновата чувствителност (Qiao et al., 2006). Адипонектинът индуцира адипоцитната диференциация, повишавайки инсулиновата чувствителност в мастната тъкан. Усилване на чувствителността на тъканите към съответните адипокини би намалило необходимостта от усилената им синтеза. Поради това че изследваните индивиди са напълно здрави и с нормално тегло, то може да се очаква нивата на адипонектина да спадат. Фактът, че се отчита и лека тенденция на понижение в ИТМ предполага понижение в количеството на мастната тъкан. При редукция на мастната тъкан и индуциране на лептиновата чувствителност нивата на лептин в серум се понижават, което би могло да обясни и получените от нас резултати. Вероятно, определени съединения в екстракт повлияват нивата на изследваните адипокини, но предвид комплексността му изясняването на подобен ефект изисква допълнителни изследвания, които да определят механизми на действие на отделни биологично активни вещества от извлеките от плодове на бязак.

Едномесечната консумация на чай от бязак понижи плазмените нива на CRP и IL-1 β ($p < 0,05$) (фиг. 57, 58) и показва тенденция на слабо понижение в нивата на IL-6 и TNF α проинфламаторните цитокини. Богати на полифеноли и антоцианини растителни екстракти могат да понижават нивата на провъзпалителни цитокини *in vitro*, като понижават продукцията на простаноиди (Russell, 2007; Youdim et al., 2002). Потискането на възпалението, индуцирано от

citoкини като TNF α , води до повишаване на инсулиновата чувствителност, потискайки индуцирането на NF- κ B (Yeung et al., 2004, Yang et al., 2007). Експериментите с клетъчни култури демонстрираха способността на екстракта да индуцира Sirt-1 (фиг. 60) и да понижава генните експресии на ICAM-1 (фиг. 59) и IL-6, тенденция, която бе наблюдавана и при хора. Активирането на Sirt-1 подобрява инсулиновата чувствителност, като потиска NF- κ B медираното индуциране на възпаление (Hou et al., 2005; Pergola et al., 2006). Инхибирането на транскрипционният фактор би довело до снемане на потискащото действие на възпалението върху инсулиновата чувствителност. Повишените нива на проинфламаторни цитокини при хора корелират правопрпорционално с ИТМ. При затлъстяване нивата на CRP, MCP-1, IL-6 и TNF α се повишават минимум 10 пъти (Herder et al., 2006, 2005; Muller et al., 2002; Kim et al., 2006). Повишените нива на IL-1 β в ендотелни, мастни и мускулни клетки водят до нарушаване на инсулиновата сигнализация (de Luca and Olefsky, 2008). Така получените в настоящото изследване предполагат противвъзпалително действие на плодовете от бъзак като вероятен механизъм за потенциалното им терапевтично действие при инсулинова резистентност и затлъстяване.

Може да се обобщи, че потенциалното антиобезитно, противодиабетно и антиатерогенно действие на чаят от плодове на бъзак се дължи на високата му АОА, способността му да повишава ТАС на серум, да подобрява липидния профил и понижава продукцията на провъзпалителни цитокини. Потискайки развитието на възпаление, чаят от бъзак може да намали риска и от развитие на инсулинова резистентност. При хора в риск бъзакът би имал значение за превенция, а при вече настъпили патологични състояния – и терапевтичен ефект.

5. Заключение

Билковият екстракт от бязак е богат на полифеноли и антоцианини. Той проявява висока АОА *in vitro*, както и активира генната експресия на ензими от АО защита на организма при 3T3-L1 преадипоцитни и J774A.1 макрофажни клетъчни култури. Проявява имуностимулиращо действие, активирайки генната експресия на цитокини при нестимулирани макрофаги и противовъзпалително действие *in vitro*, понижавайки генната експресия и белтъчните нива провъзпалителни протеини при LPS стимулирани J774A.1 макрофаги. Тези ефекти при здрави доброволци резултират в повишаване на ТАС на серум, понижаване нивата на глюкоза, на ТАГ, на общия и LDL-холестерола, на провъзпалителните цитокини, повишаване HDL-холестерола *in vivo*, с което се явява многообещаващо потенциално анти-обезитно, анти-хиперлипидемично, анти-атерогенно средство. Включването му в диетата като хранителна добавка би благоприятствало АО и противовъзпалителни защитни сили на организма. Това би осигурило естествена превенция срещу развитието на възпаление и оксидативен стрес, в т.ч. съпътстващи затлъстяването, инсулиновата резистентност, метаболитния синдром и диабет тип 2.

6. Изводи и приноси

6.1. Изводи

Фитохимичен състав, антиоксидантна активност и цитотоксичност

1. Съдържанието на тотални полифеноли и антоцианини в екстракти от *S. ebulus* зависи от вида и концентрацията на екстрагента:

- най-високо съдържание на тотални полифеноли се установява във водния екстракт;
- най-високо съдържание на антоцианини се установява в 40% и 60% водно-етанолови екстракти;

2. Антиоксидантната активност на екстрактите корелира в по-голяма степен със съдържанието на полифеноли, отколкото със съдържанието на антоцианини,

Ефекти на екстракти от плодове на *S. ebulus* върху клетъчни култури

3. Водният екстракт от плодове на *S. ebulus* не проявява цитотоксично действие върху преадипоцити и макрофаги, като в ниските концентрации дори активира клетъчната пролиферация.

4. С увеличаване на концентрацията на липополизахаридите в модел на индуцирано възпаление, жизнеността на макрофагите се потиска с около 15%.

6. Салициловата киселина не проявява цитотоксично действие в концентрации от 50 μM до 400 μM , а в ниските концентрации има индуциращ ефект върху пролиферацията при макрофаги.

7. Етанолът потиска жизнеността на преадипоцити с до 50%, като този ефект корелира с процентното му съдържание в хранителната среда.

8. Етилацетатната фракция от плодове на *S. ebulus* има цитопротективно действие, предотвратявайки етанол-индуцираната клетъчна смърт, като в същото време увеличава жизнеността на преадипоцити с около 30%.

9. Етанолът в концентрации от 0,125 до 0,5% в хранителна среда индуцира генната експресия на провъзпалителните протеини TNF α , COX-2 и iNOS в преадипоцити.

10. Липополизахариди в концентрации от 50 до 300ng/ml индуцират генната експресия на провъзпалителните протеини TNF α , COX-2 и iNOS в макрофаги.

11. Воден екстракт от плодове на *S. ebulus* приложен върху преадипоцитни клетки:

- индуцира генната експресията на ензимите от метаболизма на глутатион: дозозависимо GCLc и слабо - GPx-4;
- индуцира в ниска степен генната експресия на провъзпалителните белтъци TNF α , COX-2, iNOS;
- индуцира в ниска степен генната експресията на транскрипционният фактор NF- κB ;

12. В оксидативно стимулирани преадипоцити воден екстракт от плодове на *S. ebulus*:

- проявява антиоксидантни свойства, като дозозависимо понижава експресията на ензимите GCLc и GPx-4;
- проявява противовъзпалително действие като дозозависимо понижава експресията на провъзпалителните белтъци TNF α , COX-2, iNOS и NF- κB .

13. В модел на етанол-индуцирано възпаление в преадипоцити, етилацетатна фракция от плодове на *S. ebulus* проявява противовъзпалително действие, като дозозависимо понижава генната експресия на провъзпалителните белтъци TNF α , IL-6, COX-2 и iNOS.

14. В отсъствие на индуктор на възпаление в макрофаги, воден екстракт от плодове на *S. ebulus*:

- индуцира дозозависимо генната експресия на GCLc и GPx-4;
- проявява имуностимулиращо действие, индуцирайки генната експресия на белтъци, пряко свързани с контрола и протичането на възпалителен процес: TNF α , IL-6, MCP-1, ICAM-1, Nox α 1, aP2, COX-2, iNOS и NF- κB , както и белтъчните нива на ензима iNOS;
- понижава генната експресията на IL-1 β , докато повишава тази на IL-1RN;
- индуцира генната експресия на Sirt-1;

- понижава нивата на белтъците ATF6 α и CHOP, свързани с индукцията на ER стрес;
 - предотвратява стрес-индуцирани конформационни промени в белтъци, синтезирани в ендоплазмения ретикулум;
15. В модел на LPS индуцирано възпаление в макрофаги, воден екстракт от плодове на *S.*

ebulus:

- проявява антиоксидантни свойства, като дозозависимо понижава експресия на ензимите GCLc и GPx-4;
- проявява противовъзпалително действие, като дозозависимо понижава генната експресия на белтъци, пряко свързани с контрола и протичането на възпалителен процес: TNF α , IL-6, IL-1RN, MCP-1, ICAM-1, Nox1, aP2, NF- κ B, COX-2 и iNOS, както и белтъчните нива на ензима iNOS;
- потиска развитието на ER-стрес като понижава продукцията на транскрипционните фактори ATF6 α , p ℓ F2 α и CHOP;
- инхибира транскрипция на Sirt-1.

Ефекти на воден екстракт от плодове на *S. ebulus* при клинично здрави доброволци

16. Едномесечен прием на чай от плодове на *S. ebulus*:

- проявява антиоксидантна активност, като повишава с 20% тоталния антиоксидантен статус и тотални тиоли в серум;
- проявява хипогликемично действие, като понижава нивата на кръвна захар;
- проявява антиатерогенно, хиполипидемично действие, като понижава нивата на триглицериди, общ и LDL-холестерол и значително повишава съотношението HDL/LDL-холестерол в серум;
- проявява противовъзпалително и анти-атерогенно действие, понижавайки плазмените нива на CRP, IL-1 β , IL-6, TNF α и генната експресия на ICAM-1;
- повишава експресията на ген от инсулиновия сигнален път Sirt-1 и понижава нивата на лептин.

6.2. Приноси

1. За първи път са представени сравнителни данни за съдържанието на полифеноли и антоциани, както и за антиоксидантната активност на воден и водно-етанолни екстракти от плодове на *S. ebulus* в зависимост от вида и концентрацията на екстрагента.
2. За първи път е установено, че тотален воден екстракт и етилацетатна фракция от плодове на *S. ebulus* повлияват експресията на редокс сензитивни гени и на гени на провъзпалителни протеини в клетъчни култури в норма и в условия на индуцирано възпаление.
3. За първи път е анализиран ефектът на етанол върху транскрипционните нива на провъзпалителни белтъци в преадипоцити.
4. За първи път е анализирано влиянието на воден екстракт от плодове на *S. ebulus* върху вътреклетъчната концентрация на провъзпалителни белтъци и такива свързани с развитието на ER стрес в модел на индуцирано възпаление в макрофаги.
5. Получени са първите научни доказателства, че воден извлек от плодове на *S. ebulus* повишава антиоксидантния капацитет при хора.
6. За първи път е установено, че консумацията на чай от плодове на *S. ebulus* подобрява липидния профил при здрави индивиди, свидетелство за потенциала на билката в профилактиката на сърдечно-съдовите заболявания.
7. Получени са първите научни доказателства за противовъзпалителното, антиобезитно и антиатерогенно действие, както и за противодиабетния потенциал на чай от плодове на *S. ebulus* при хора, чрез повлияване експресията на проинфламаторни цитокини, адхезионни фактори и гени свързани с инсулиновия сигнален път.

7. Списък на често използваните съкращения

AOA	– антиоксидантна активност
AP-1	– activator protein-1 (активаторен протеин-1)
aP2	– адипоцитен ацил-свързващ протеин
ARE/EpRE	– Antioxidant/Electrophyl Response Element (Антиоксидант /електрофил респонсен елемент)
ATF6	– активиращ транскрипционен фактор 6
CHOP	– C/EBP homologous protein
COX-2	– индуцируема циклооксигеназа
eIF2 α	– eukaryotic initiation factor 2
ER stress	– ендоплазматичен ретикулум стрес
GCLc	– γ -глутаминцистеин лигаза каталитична субединица
GPx4	– глутатион пероксидаза 4
GS	– глутатион синтетаза
GSH	– редуциран глутатион
GSSG	– окислен глутатион
hsCRP	– C-reactive protein (C-реактивен протеин)
ICAM	– intracellular adhesion molecule-1/ вътреклетъчен адхезионен протеин-1
I κ B	– инхибитор на NF- κ B
IL-1RN	– интерлевкин 1 рецептор антагонист
IL-1 β	– интерлевкин 1 бета
IL-6	– интерлевкин-6
iNOS	– индуцируема NO синтаза
IKK	– киназа на I κ B
КА	– концентрация на антоцианини
LPS	– липополизахариди
MCP-1	– macrophage chemotactic protein (макрофажен хемотаксисен протеин)
MTT	– 3-(4,5-диметитиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид
NF- κ B	– нуклеарен фактор капа В
Noxo-1	– NADP.H organizer subunit 1 (p47phox)
PBS	– Phosphate buffered saline (изотоничен фосфатен буфер)
PCR	– polymerase chain reaction (полимеразна верижна реакция)
Real-Time PCR	– PCR в реално време
RT-PCR	– Reverse Transcription PCR (обратна транскрипция – PCR)
SEF	– етилацетатна фракция от плодове на бязак
Sirt-1	– сиртуин 1
t-ButOОН	– tert-butylhydroperoxide (третичен бутилов хидропероксид)
TNF- α	– tumor necrosis factor alpha (тумор некрозисен фактор алфа)
АКФ	– активни кислородни форми
ЕАФ	– етилацетатна фракция
КП	– концентрация на полифеноли
МАР киназа	– митоген активирана протеин киназа
МАРК киназа	– киназа на МАР
МАРКК киназа	– киназа на МАРК
МДА	– малонов диалдехид
ПФ	– полифенол
ССЗ	– сърдечно-съдови заболявания
ТТ	– тотални тиоли
Цит P450	– Цитохром P450

8. Списък на публикации и участия във връзка с дисертационния труд

8.1. Публикации свързани с дисертационния труд:

1. Ivanova D., Tasinov O., Kiselova-Kaneva Y. **2014**. Improved lipid profile and increased serum antioxidant capacity in healthy volunteers after *Sambucus ebulus* L. fruit infusion consumption. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, V 65(6), 740-744. (IF:1,26).
2. **Tasinov O.**, Kiselova-Kaneva Y., Ivanova D. **2013**. *Sambucus ebulus* - from traditional medicine to recent studies. *Scripta Scientifica Medica*, V 45 (2), 36-42.
3. **Tasinov O.**, Kiselova-Kaneva Y., Ivanova D. **2013**. *Sambucus ebulus* L. fruit aqueous infusion modulates GCL and GPx4 gene expression. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, V 19 (2), 143-146 (IF: 0,14).
4. Kiselova-Kaneva Y., **Tasinov O.**, Vankova D., Ivanova D. **2012**. Ethanol induces IL-6 and TNF- α cytokine and iNOS and COX-2 enzyme gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. *Scripta Scientifica Medica*, V 44 (2), 31-35.
5. **Tasinov O.**, Kiselova-Kaneva Y., Ivanova D. **2012**. Antioxidant activity, total polyphenol content and anthocyanins content of *Sambucus ebulus* L. aqueous and aqueous – ethanolic extracts depend on the type and concentration of extract. *Science & Technologies*, V 2 (1), 37-41.

8.2. Участия в международни научни форуми свързани с дисертационния труд:

1. **Tasinov O.**, Kiselova-Kaneva Y., Ivanova D. Dwarf elder fruit infusion suppresses LPS induced MCP-1 and ICAM-1 gene expression. The 11th NuGO week “Nutrigenomics of foods”, Castellemmare di Stabia, Napoli, Italy, 8-11th September **2014**, p. 61.
2. **Tasinov O.**, Kiselova-Kaneva Y., Ivanova D. *Sambucus ebulus* L. tea consumption affects leptin and adiponectin levels in healthy volunteers. 21th European Congress on Obesity (ECO), Sofia, Bulgaria, 28-31 May **2014**. Obesity Facts 2014, 7(1) 1-188, p. 129.
3. **Tasinov O.**, Kiselova-Kaneva Y., Ivanova D. Dwarf elder suppresses LPS induced TNF α and IL-6 gene expression. 13th International Congress of Medical Sciences (ICMS), Sofia, Bulgaria, 8-11 May **2014**.
4. Nashar M., **Tasinov O.**, Vankova D., Nazifova N., Kiselova Y., D. Ivanova. Biological effects and therapeutic potential of *Sambucus ebulus* and *Agrimonia eupatoria* in healthy volunteers: comparative intervention study. International conference on natural products utilization (ICNPU): from plants to pharmacy shelf, Bansko, Bulgaria, 3-6 November **2013**.
5. Ivanova D., **Tasinov O.**, Nazifova N., Kiselova-Kaneva Y. *Sambucus ebulus* fruit extracts reduce TNF α and IL6 expression elevated in ethanol-treated 3T3-L1 preadipocytes. 20th International Congress of Nutrition Granada, Spain, 15-20 September **2013**; Annals of Nutrition & Metabolism 2013, 63(1), 1–1960, p. 294.
6. Ivanova D., **Tasinov O.**, Vankova D., Kiselova-Kaneva Y. Bulgarian medicinal plants with a potential to improve lipid profile in healthy volunteers. 20th International Congress of Nutrition Granada, Spain, 15-20 September **2013**; Annals of Nutrition & Metabolism 2013, 63(1), 1–1960, p. 1593.
7. Ivanova D., **Tasinov O.**, Vankova D., Kiselova-Kaneva Y. Hypolipidemic and hypoglycemic activity of *Sambucus ebulus* L. fruit tea in healthy volunteers. 32nd Balcan Medical Week, Nis, Serbia, 21-23 September **2012**.
8. **Tasinov O.**, Kiselova-Kaneva Y., Ivanova D. *Sambucus ebulus* fruits suppress ethanol induced cytotoxicity and iNOS and COX-2 gene expression in 3T3-L1 mouse preadipocytes. 11th International Congress of Medical Sciences (ICMS) Sofia, Bulgaria, 03-06 May, **2012**.

9. Финансиране

1. COST Action BM0602: “Adipose Tissue: A Key Target for Prevention of the Metabolic Syndrome”; Funded by the EC. Duration 2007/2010; Договор № ДКОФ7РП02/13/ 05.07.2010 г. за национално съфинансиране на научен проект BM602

2. ПРОЕКТ BG051PO001-3.3.06-0028 „Повишаване на научния потенциал и възможностите за кариерно развитие в областта на медицината, здравеопазването и биотехнологиите” на Медицински университет “ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ” – ВАРНА. Проектът е финансиран по Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси” съвместно с Европейски социален фонд и Министерство на образованието и науката.

3. Изследване влиянието на екстракт от *Sambucus ebulus* L. (Бъзак) върху нивата на енергийни маркери, свързани със липогенезата и инсулинова чувствителност“.

Финансиран със стипендия на МОН, по ПРОЕКТ „Наука-бизнес” BG051PO001-3.3.05-0001, по ОП „Развитие на човешките ресурси”, съфинансирана от Европейския социален фонд на Европейския съюз. Едномесечно обучение/специализация във високотехнологичен научно-изследователски център по Молекулярна медицина и хронични заболявания (CIMUS), към университета на Сантяго де Компостела, Испания, под прякото ръководство на Проф. Карлос Диегес и Проф. Д-р Рубен Ногиерес, в периода 25.01-25.02.2014г.