

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

**Милена Гинчева Пашева**

**ПРОУЧВАНЕ МЕТАБОЛИТНИТЕ ЕФЕКТИ  
НА ВОДНО-АЛКОХОЛНИ ЕКСТРАКТИ ОТ ДЪРВЕСИНИ  
С ТРАДИЦИОННО ПРИЛОЖЕНИЕ В БЪЛГАРИЯ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**на дисертационен труд за присъждане  
на образователната и научна степен  
“доктор” по научна специалност Биохимия**

**Научни ръководители:  
Проф. Диана Иванова, д.б.н.  
Гл.ас. Милка Нашар, д.ф.**

**ВАРНА  
2015**

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

---

**Милена Гинчева Пашева**

**ПРОУЧВАНЕ МЕТАБОЛИТНИТЕ ЕФЕКТИ**  
**НА ВОДНО-АЛКОХОЛНИ ЕКСТРАКТИ ОТ ДЪРВЕСИНИ**  
**С ТРАДИЦИОННО ПРИЛОЖЕНИЕ В БЪЛГАРИЯ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**на дисертационен труд за присъждане**  
**на образователната и научна степен**  
**“доктор” по научна специалност Биохимия**

**Научни ръководители:**  
**Проф. Диана Иванова, д.б.н.**  
**Гл.ас. Милка Нашар, д.ф.**

**Официални рецензенти:**  
**Проф. Татяна Влайкова, д.б.**  
**Доц. Татяна Янкова, д.б.**

**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 151 страници, 31 фигури и 7 таблици. Цитирани са 333 заглавия, от които 21 са на кирилица, а останалите на латиница .*

*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.*

*Публичната защитата на дисертационния труд ще се проведе на 26.10.2015 година от 15:00 часа в трета аудитория на Ректората на Медицински университет – Варна.*

# СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ .....	7
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	8
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ .....	10
1. Растителен материал .....	10
2. Измерване концентрацията на полифеноли на етанолови извлекци от подбрани дървесини .....	10
3. Определяне на антиоксидантна активност на етанолови извлекци от подбрани дървесини .....	11
4. Определяне съдържанието на флавоноиди в етанолов екстракт и извлек от дървесина на <i>M. nigra</i> .....	11
5. Определяне на концентрация на танини в етанолов екстракт и извлек от дървесина на <i>M. nigra</i> .....	11
6. Клетъчни линии и субкултивиране на клетъчни култури .....	11
7. Тест за цитотоксичност .....	12
8. Модели на клетъчни култури използвани при <i>in vitro</i> изследванията .....	12
9. Определяне нивата на генна експресия.....	12
10. Статистическа обработка и графично представяне на данните.....	13
IV. РЕЗУЛТАТИ .....	15
1. Сравняване на общото полифенолно съдържание (ОПС) и антиоксидантна активност (АОА) на етанолови извлекци от дървесини на подбрани дървесни видове в зависимост от времето на екстракция. ....	15
2. Определяне фитохимичния състав на етанолови екстракти и 40% водно-етанолов извлек от дървесина на <i>M. nigra</i> .....	17
3. Определяне влиянието на етанолов извлек от дървесина на <i>M.</i> <i>nigra</i> върху жизнеността на клетъчни култури .....	18
4. Изследване антиоксидантното действие на етанолов извлек на <i>M. nigra</i> при клетъчни култури в модел на t-ButOОН-индуциран оксидативен стрес.....	20
5. Изследване на противовъзпалителното действие на етанолов извлек от <i>M. nigra</i> при клетъчни култури в модел на LPS- индуцирано възпаление. ....	33
6. Изследване на антиобезитния потенциал на етанолов извлек от <i>M. nigra</i> в диференцирани адипоцити.....	43
V. ДИСКУСИЯ .....	44

VI. ИЗВОДИ .....	63
VII. ПРИНОСИ.....	65
VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....	66
IX. ФИНАНСИРАНЕ .....	68

## СПИСЪК НА ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

Akt	– протеин киназа B
aP2/FABP4	– мастни киселини - свързващ протеин
C/EBP	– ССААТ-enhancer-binding protein (стерол регулаторен елемент - свързващ протеин)
COX-2	– циклооксигеназа 2
GCL	– $\gamma$ -глутамилцистеин лигаза
GHS	– глутатион
GLUT4	– транспортен протеин за глюкоза тип 4
GPx	– глутатион пероксидаза
HDL	– липопротеинов комплекс с висока плътност
ICAM-1	– intercellular adhesion molecule (междуклетъчна адхезионна молекула)
IL-1 $\beta$	– интерлевкин 1 $\beta$
IL-6	– интерлевкин 6
iNOS	– индуцируема азотен оксид синтаза
LDL	– липопротеинов комплекс с ниска плътност
LOX	– липоксигеназа
LPS	– липополизахариди
MCP-1	– макрофажен хемотаксисен протеин-1
NF-kB	– нуклеарен фактор капа B
PPAR $\gamma$	– пероксизомен пролифератор-активиран рецептор гама
SA	– салицилова киселина
Sirt – 1	– сиртуин 1
SOD	– супероксид дисмутаза
t-ButOOH	– третичен бутилов хидропероксид
TNF $\alpha$	– тумор-некротизиращ фактор алфа
VCAM – 1	– vascular cell adhesion molecule (адхезионна молекула на съдовите клетки)
АКФ	– активни кислородни форми
АОА	– антиоксидантна активност
ВМК	– висши мастни киселини
МАРК	– митоген активирана протеин киназа
ОПС	– общо полифенолно съдържание



## I. ВЪВЕДЕНИЕ

Благодарение на свойствата си да асимилират прости молекули и да ги включват в сложни биологично активни продукти, растенията представляват неизчерпаем източник на компоненти за разработване на нови лекарства. Бързо нарастващото научно познание в тази област се обяснява с възродения интерес на изследователите към лечебната сила на растенията, на базата на данни от народната медицина и фолклора. Още през 1977 г. д-р Н. Малер, тогавашен генерален директор на Световната здравна организация, изказва твърдение, че „само слепецът може да мисли, че съвременната медицина няма какво да научи от народната медицина“.

Елинският природоизследовател и философ Теофраст отбелязва в своя труд „Изследвания на растенията“, че Тракия е най-богатият на лечебни растения район в тогавашния свят (Петков, 1982). Благодарение на разнообразните климатични и почвени условия на региона, българските растения съдържат висок процент биологично активни вещества. Те са богати на разнообразни химични съединения като алкалоиди, гликозиди, сапонини, полизахариди, дъбилни вещества (танини), флавоноиди, лигнани, кумарини, етерични масла, витамини, микроелементи и др. Лечебните ефекти и приложението на много от тях е изучено. В световната практика около 40% от лекарствените препарати, получени от химико-фармацевтичната промишленост се приготвят от растителни суровини.

Знанията за лечебния потенциал на някои популярни дървесни видове се базират на благотворните ефекти на различни препарати от плодове, цветове, листа и кора. Въпреки че дървесините на тези растения намират приложение за производство на съдове за отлежаване и оцветяване на високоалкохолни напитки, все още липсват достатъчно научни данни за ефекта на екстрахираните активни компоненти върху човешкото здраве.



## II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

### ЦЕЛ

Да бъдат изследвани ефектите на водно-алкохолни извлеци от дървесина с традиционно приложение в България, върху нормалния метаболизъм и при *in vitro* модели на метаболитни нарушения.

### ЗАДАЧИ

1. Анализ на емпирични данни за приложението на водно-алкохолни извлеци от дървесина с традиционно приложение в България.
2. Проучване промяната в общото полифенолно съдържание и в антиоксидантната активност на водно-етанолови извлеци от дървесина от подбрани дървесни видове в зависимост от времето на екстракция.
  - 2.1. Установяване на извлека с най-високи антиоксидантна активност и концентрация на полифеноли.
3. Изследване на фитохимичния състав на водно-етанолов извлек от дървесина на избраното растение.
4. Изследване ефекта на водно-етаноловия извлек от дървесина на избраното растение върху жизнеността на клетъчни култури.
  - 4.1. *Определяне влиянието на водно-етанолов извлек от дървесина на избраното растение върху жизнеността на 3T3-L1 преадипоцити;*
  - 4.2. *Определяне влиянието на водно-етанолов извлек от дървесина на избраното растение върху жизнеността на J744A.1 макрофаги.*
5. Изследване на антиоксидантното действие на водно-етаноловия извлек от дървесина на избраното растение върху модели на клетъчни култури, чрез проследяване влиянието му върху:
  - 5.1. *Експресия на редокс-чувствителни гени в условия на индуциран оксидативен стрес;*

- 5.2. *Експресия на проинфламаторни цитокини в клетъчни култури в условия на индуциран оксидативен стрес.*
6. Изследване на противовъзпалително действие на водно-етаноловия извлек от дървесина на избраното растение върху модели на клетъчни култури, чрез проследяване влиянието му върху:
- 6.1. *Експресия на редокс чувствителни гени в условия на индуцирано възпаление;*
- 6.2. *Експресия на проинфламаторни цитокини в клетъчни култури в условия на индуцирано възпаление.*
7. Изследване на антиобезитният потенциал на водно-етаноловия извлек на дървесина от избраното растение чрез:
- 7.1. *Влияние върху експресията на гени свързани с адипогенезата.*

### III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### 1. Растителен материал

Изходен материал за приготвяне на водно-етаноловите извлеци е суха сърцевина от стъбла на черна черница (*M. nigra* L.), салкъм (*R. Pseudoacacia* L.), смрадлика (*C. Coggygia* Scop.) и препечен чипс от летен дъб (*Q. Robur* L.). Спазена е популярната технология на „опушване“ на дървесината: треските се варят 10 минути, след което се накусват в студена вода за 24 часа и се изсушават за 15 минути при температура 150-190° C.

#### *Приготвяне на водно-етанолови извлеци от дървесина*

За приготвяне на извлеците е спазена пропорцията от традиционната рецепта за оцветяване на ракия: 2g дървесина за 1 литър ракия. Предварително обработените проби от четирите дървесни вида се внасят в 40% етанол и престояват в тъмни стъклени бутилки в продължение на 60 дни. За контрола при *in vitro* експериментите служи 40% етанол.

#### *Приготвяне на етанолови екстракти от дървесина*

За получаване на екстрактите е приложен непрекъснат метод за горещо извличане на Сокслет апарат. Двадесет грама от нарязаната на стърготини дървесина се опакова и се екстрахира в апарат на Сокслет в продължение на 8 часа. Като разтворители се използват 200 ml 96 % и 40% етанол.

#### 2. Измерване концентрацията на полифеноли на етанолови извлеци от избрани дървесини

Общото полифенолно съдържание (ОПС) е измерено посредством спектрофотометричния метод на Singleton and Rossi (1965). Концентрацията на полифеноли е определена чрез калибровъчна крива, построена от стойностите на абсорбциите на стандартни разтвори и е представена като mM кверцетинови еквиваленти (mM QE). Измерванията са извършени на многофункционален четец Synergy 2 (BioTek).

### **3. Определяне на антиоксидантна активност на етанолови извлекци от избрани дървесини**

Антиоксидантната активност (АОА) е определена чрез АВТS [2,2'-азинобис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонова киселина)] катион радикал обезцветяващ метод (Re et al., 1999). Данните за АОА са представени като mM еквиваленти пикочна киселина (mM UAE). Измерванията са извършени на спектрофотометър (CampesM 501).

### **4. Определяне съдържанието на флавоноиди в етанолов екстракт и извлек от дървесина на *M. nigra***

Съдържанието на флавоноиди е измерено чрез алуминиев хлорид колориметричен анализ (Vijay et al., 2014). Общото съдържание на флавоноиди е изразено в кверцетинови еквиваленти и е представено като µg QE/ml екстракт.

### **5. Определяне на концентрация на танини в етанолов екстракт и извлек от дървесина на *M. nigra***

Концентрацията на танини се измерва чрез Folin-Ciocalteu спектрофотометричен метод (Vijay et al., 2014). Общото съдържание на танини е определено чрез калибровъчна крива, построена от стойностите на абсорбциите на стандартни разтвори на галова киселина (GAE) и е представено като µg GAE/ml.

### **6. Клетъчни линии и субкултивиране на клетъчни култури**

Клетъчните линии използвани в *in vitro* експериментите са закупени от АТСС (American Type Culture Collection) – САЩ.

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

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

Клетъчните култури се субкултивират в 75cm<sup>2</sup> фласки като не се допуска да превишат 70-80% конfluентност. След отстраняване на старата хранителна среда клетките се промиват с 2 ml PBS. След добавяне на свежа хранителна среда, клетките се събират и след преброяване се засяват с необходимата гъстота за провеждане на експеримент или за последващо субкултивиране. Клетъчните култури се инкубират на тъмно при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Съхраняват се в течен азот.

## **7. Тест за цитотоксичност**

Тестът за цитотоксичност се извършва по метода на Mosmann (1983) с някои модификации (Kiselova-Kaneva et al., 2012). Жизнеността на третираниите клетки се определя като процент от нетретирания контрол, чиято жизненост се приема за 100%. Абсорбцията се измерва при  $\lambda=550$  nm на многофункционален четец Synergy 2 (BioTek).

## **8. Модели на клетъчни култури използвани при *in vitro* изследванията**

Използваните експериментални модели на клетъчни култури са:

- модел на третичен бутилов хидропероксид (t-ButOОН) индуциран оксидативен стрес при 3T3-L1 преадипоцити и J774A.1 макрофаги
- модел на индуцирано възпаление с LPS от стандартен щам на *Escherichia coli* серотип 026:B6 при J774A.1 макрофаги
- диференциране на 3T3-L1 преадипоцити

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

За определяне нивата на генна експресия се използва двустъпков количествен Real-Time PCR.

### ***Изолиране на РНК от клетки***

Изолирането на РНК от клетки се извършва с TriReagent, като лабораторният протокол следва напълно указанията на производителя.

### ***Пречистване на изолираната тотална РНК***

За пречистване на изолираната РНК от контаминация с геномна ДНК

беше приложено ДНКазно третиране с DNase I RiboPure™-Blood Kit (SIGMA), като лабораторният протокол следва напълно указанията на производителя. Реакцията е осъществена на GeneAmp PCR 7500 thermal cycler (Applied Biosystems).

#### ***Обратна транскрипция – RT-PCR***

Първата стъпка при количествен Real-Time PCR анализ е осъществяването на обратна транскрипция на изолираната РНК и синтез на кДНК. РНК (0,1-5 µg) обратно се транскрибира с помощта на Revertaid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) съдържащ олиго (dT)<sub>18</sub> праймер и RevertAid™ обратна транскриптаза. Синтезът на кДНК се извършва на GeneAmp PCR 7500 thermal cycler (Applied Biosystems), при краен обем на реакционната смес 10 µl.

#### ***Количествен Real Time PCR***

Втората стъпка при количествен Real-Time PCR анализ е амплификация на кДНК в реално време с помощта на ген-специфични праймери. Нуклеотидната последователност на праймерите е представена в таблица 1. Анализът се извършва с ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems).

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

Статистическата обработка на данните е извършена с помощта на еднофакторен вариационен анализ (one-way ANOVA), последван от Dunnett's multiple comparison test. Две независими групи са сравнявани със Student's t-test. Получените стойности са представени като средна стойност от минимум три измервания ± стандартна грешка на средната стойност (Mean ±SEM). Статистическа достоверност се приема при  $p < 0.05$ . За анализ и графичното представяне на резултатите е използвана статистическата програма GraphPadPrism (ver. 5.00, GraphPad Software Inc.).

**Таблица 1.** Олигонуклеотидна последователност на използваните при Real Time-qPCR анализ праймери.

Ген	Нуклеотидна секвенция
<b><math>\beta</math>-actin</b> (Sigma-Aldrich, Germany)	F: 5'-ACGGCCAGGTCATCACTATTG-3' R: 5'-CAAGAAGGAAGGCTGGAAAAG-3'
<b>GCLc</b> (Alpha DNA, Canada)	F: 5'-AATGGAGGCGATGTTCTTGAG-3' R: 5'-CAGAGGGTCGGATGGTTGG-3'
<b>GPx-4</b> (Sigma-Aldrich, Germany)	F: 5'-CCCCACTGCGCTCATGA-3' R: 5'-GGCACACCGGAGACCAAA-3'
<b>NF-kB1</b> (Bioneer)	F: 5'-ATGGCAGACGATGATCCCTAC-3' R: 5'-TGTTGACAGTGGTATTTCTGGTG-3'
<b>TNF<math>\alpha</math></b> (Alpha DNA, Canada)	F: 5'-CCCTCACACTCAGATCATCTTCT-3' R: 5'-GCTACGACGTGGGCTACAG-3'
<b>IL-6</b> (Alpha DNA, Canada)	F: 5'-GAGTTGTGCAATGGCAATTCTG-3' R: 5'-GCAAGTGCATCATCGTTGTTTCAT-3'
<b>IL-1<math>\beta</math></b> (Alpha DNA, Canada)	F: 5'-TTCAGGCAGGCAGTATCACTC-3' R: 5'-CCACGGGAAAGACACAGGTAG-3'
<b>COX-2</b> (Alpha DNA, Canada)	F: 5'-TGAGCAACTATTCCAAACCAGC-3' R: 5'-GCACGTAGTCTTCGATCACTATC-3'
<b>iNOS</b> (Alpha DNA, Canada)	F: 5'-GGCAGCCTGTGAGACCTTTG-3' R: 5'-GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC-3'
<b>Sirt-1</b> (Bioneer)	F: 5'-TGATTGGCACCGATCCTCG-3' R: 5'-CCACAGCGTCATATCATCCAG-3'
<b>ICAM-1</b> (Invitrogene)	F: 5'-GACCCCAAGGAGATCACATTC-3' R: 5'-GAAGATCGAAAGTCCGGA-3'
<b>aP2</b> (Invitrogene)	F: 5'-AGT GAA AAC TTC GAT GAT TAC ATG AA-3' R: 5'-GCC TGC CAC TTT CCT TGT G-3'
<b>PPAR<math>\gamma</math></b> (Alpha DNA, Canada)	F: 5'-AAA AAC CCT TGC ATC CTT CAC AAG CAT-3' R: 5'-TCA ATC GGA TGG TTC TTC GG-3'
<b>C/EBP<math>\alpha</math></b> (Invitrogene)	F: 5'-AGC AAC GAG TAC CGG GTA CG-3' R: 5'-TGT TTG GCT TTA TCT CGG CTC-3'

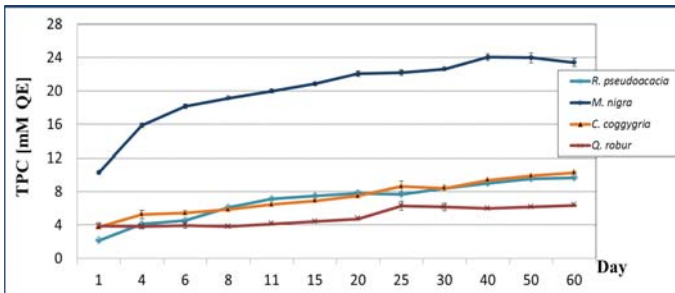
## IV. РЕЗУЛТАТИ

### 1. Сравняване на общото полифенолно съдържание (ОПС) и антиоксидантна активност (АОА) на етанолови извлекци от дървесини на подбрани дървесни видове в зависимост от времето на екстракция.

С цел проследяване динамиката на екстракция на полифеноли и промяната в АОА, изследвахме 40 % етанолови извлекци на четири различни видове дървесини (черна черница, смрадлика, салкъм и дъб), като пробите бяха взимани в различни времеви точки в разстояние на 60 дни.

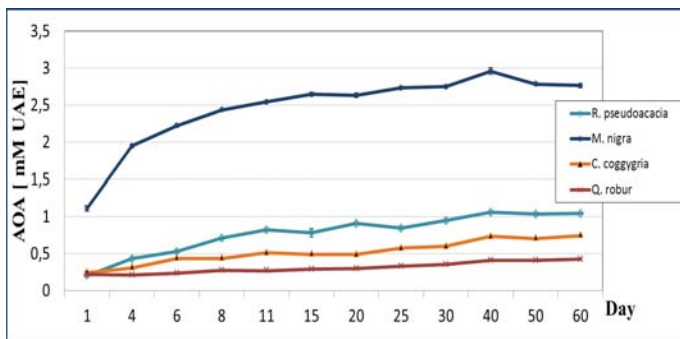
На фигура 1 са представени резултатите от измерването на ОПС на 40 % водно- етанолови извлекци от дървесини. При изследването като стандарт е използван кверцетин.

Резултатите от промяната в АОА на водно-етанолови извлекци от изследваните дървесини са представени на фигура 2. Използван е стандарт пикочна киселина.



Фиг. 1. Промяна на ОПС на 40 % водно- етанолови извлекци от различни дървесини измерено във времето





**Фиг. 2.** Промяна на АОА на 40 % водно- етанолови извлекци от различни дървесини измерена във времето

Установено бе, че водно-етаноловият извлек от дървесината на черна черница показва близо 3 пъти по-високо съдържание на полифеноли (24.05 mM QE) и антиоксидантна активност (2.96 mM UAE) в сравнение с останалите изследвани видове.

**Таблица 2.** Стойности на АОА и ОПС на 40% водно-етанолови извлекци на дървесини, измерени в 40 ден от екстракцията.

	ПФС [mM QE]	АОА [mM UAE]
<i>R. pseudoacacia</i>	9.00 ± 0.085	1.05 ± 0.007
<i>M. nigra</i>	24.05 ± 0.037	2.96 ± 0.050
<i>C. coggygia</i>	9.38 ± 0.084	0.73 ± 0.011
<i>Q. robur</i>	5.96 ± 0.020	0.40 ± 0.018

За да се определи до каква степен полифенолите допринасят за *in vitro* антиоксидантната активност на етаноловите извлекци, бе приложен корелационен анализ. Направеното проучване установи много висока степен на зависимост между ОПС и АОА и на четирите изследвани растения  $r=0,99$  (черница и салкъм),  $r=0,97$  (смадлика) и  $r=0,91$  (дъб).

Анализът по отношение на времето на екстракция показва, че нарастването на фенолното съдържание и антиоксидантния потенциал на водно-етаноловите извлекци бе най-високо до 40 ден, след което промени-

те в тези показатели бяха незначителни. Този факт бе взет под внимание при следващи *in vitro* изследвания.

Въз основа на получените резултати от сравнителния анализ в ОПС и АОА на водно-етанолови извлеци от изследваните дървесини беше избран 40% етанолов извлек от сърцевината на дървесината на *Morus nigra*, с който да бъдат извършени по-нататъшни изследвания, с цел проучване на метаболитните му ефекти в клетъчни култури.

## **2. Определяне фитохимичния състав на етанолови екстракти и 40% водно-етанолов извлек от дървесина на *M. nigra***

За да се проследи ролята на етанола като екстрагент и до колко в работния извлек са извлечени активни компоненти от дървесината, сравнихме фитохимичния му състав с два екстракта, получени чрез метода за горещо извличане на Сокслет апарат, който се определя като начин за максимална екстракция на растителни компоненти. Установено бе, че най-висока концентрация на флавоноиди съдържа 96% етанолов екстракт (504.91  $\mu\text{g QE/ml}$ ), която е близка до измерената при екстракта, получен с 40% етанол като екстрагент (471.03  $\mu\text{g Q/ml}$ ). В работния 40% водно-етанолов извлек от дървесина на черница също се отчита наличие на флавоноиди (табл. 3).

**Таблица 3.** Концентрация на флавоноиди в екстракти и извлек от дървесина на *M. nigra*

<b>Екстракт</b>	<b><math>\mu\text{g QE/ml}</math> екстракт</b>
40% водно-етанолов извлек	14.39
40% етанолов екстракт	471.03
96% етанолов екстракт	504.91

В двата изследвани етанолови екстракта се отчита еднакво съдържание на танини (табл. 4). В работния 40% водно-етанолов извлек от дървесина също се установи значително съдържание на танини (20.06  $\mu\text{g GAE/ml}$ )

**Таблица 4.** Концентрация на танини в екстракти и извлек на *M. nigra*

Екстракт	µg GAE/ml екстракт
40% водно-етанолов извлек	20.06
40 % етанолов екстракт	94.13
96 % етанолов екстракт	94.13

### **3. Определяне влиянието на етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* върху жизнеността на клетъчни култури**

#### **3.1. Влияние върху жизнеността на 3T3-L1 преадипоцити**

Измерената жизненост на преадипоцитите в резултат на третирането с етанолов извлек от дървесина на черница в сравнение с контролата етанол е представена на фигура 3.

При концентрации на извлека в хранителната среда от 0,15% до 2,5% ( $p < 0.05$ ) клетките запазиха максимална жизненост (130 и 100% съответно), докато при 0,6% съдържание на етанол в средата, жизнеността на клетките е под 100%. С нарастване съдържанието на извлека в хранителната среда, жизнеността на клетките започва да намалява, като при 5% съдържание в средата е отчетена 80% жизненост на 3T3-L1 преадипоцити, но остава по – висока от тази на клетките третирани с 40% етанол.

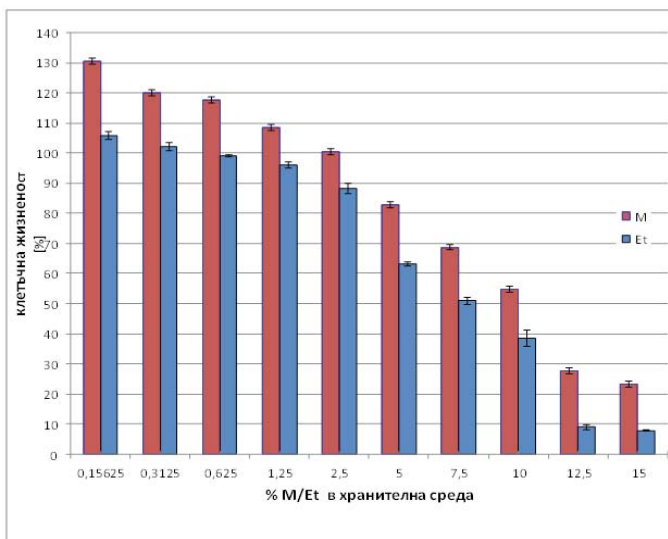
За проучване протективното действие на извлека от дървесина на *M. nigra* спрямо действието на етанола върху преадипоцитни клетъчни линии, в условия на индуциран оксидативен стрес, бяха избрани концентрации от 0.312%, 0.625% и 1.25%.

#### **3.2. Влияние върху жизнеността на J744A.1 макрофаги**

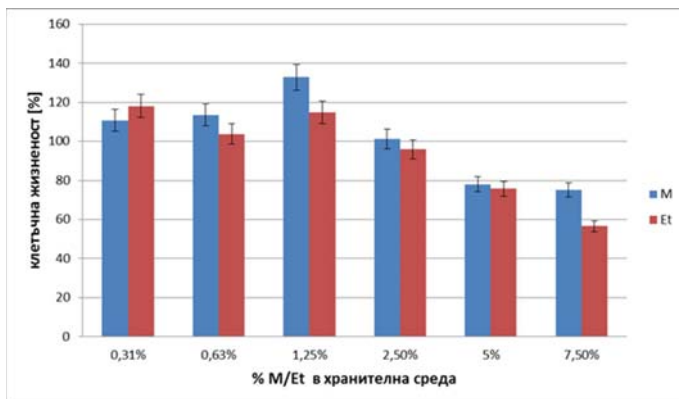
Измерената жизненост на макрофагите в резултат на третирането с етанолов извлек от дървесина на черница в сравнение с контролата е представена на фигура 4.

Значимо повишаване на клетъчната жизненост се отчита при 1,25% съдържание на извлека от дървесина на черница в хранителната среда

(приблизително 140%). Прилагането на ниски концентрации на извлекта първоначално има стимулиращ ефект. С увеличаване съдържанието му в хранителната среда клетъчната жизненост рязко се понижава, като при концентрация от 7,5% дори демонстрира цитотоксичен ефект подобен на действието на 40% етанол. За проучване протективното действие на извлекта от дървесина на *M. nigra* върху J744A.1 макрофаги в условия на оксидативен стрес и LPS индуцирано възпаление, бяха избрани същите концентрации определени и за експеримента с преадипоцити 0.312%, 0.625% и 1.25%. Изборът на еднакви концентрации при третиране на двете клетъчни линии, бе обоснован както от настоящите резултати, така и от целта експериментите да бъдат съпоставими.



**Фиг. 3.** Влияние на етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* върху жизнеността на 3T3-L1 преадипоцити



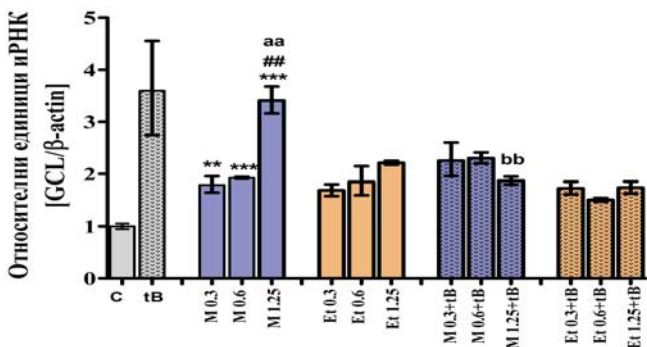
**Фиг. 4.** Влияние на етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* върху жизнестотността на J744A.1 макрофаги

#### **4. Изследване антиоксидантното действие на етанолов извлек на *M. nigra* при клетъчни култури в модел на t-ButOОН-индуциран оксидативен стрес.**

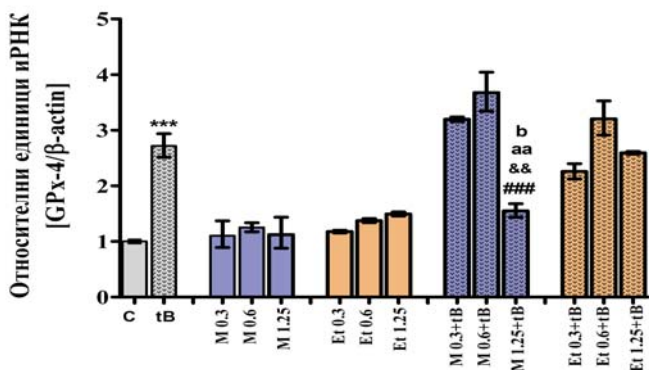
##### **4.1. Влияние върху транскрипционните нива на гени свързани с оксидативния статус.**

##### **4.1.1. Влияние върху транскрипционните нива на GCL и GPrx-4 при 3Т3-L1 преадипоцити в условия на индуциран оксидативен стрес**

При изследване действието на етаноловия извлек от черница върху експресията на гени за ензими от синтеза на глутатион в преадипоцит-на 3Т3-L1 клетъчна линия, беше установено, че извлекът, приложен самостоятелно в концентрация от 1,25% в хранителната среда, стимулира приблизително два пъти експресията на GCL в сравнение с нетретираната контрола ( $p < 0.001$ ) и спрямо същото процентно съдържание етанол ( $p < 0.01$ ), като е налице и концентрационна зависимост ( $p < 0.01$ ) (фиг. 5).



**Фиг. 5.** Експресия на гена за GCL в 3T3-L1 преадипоцити, третирани с нарастващи концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* или етанол, в нормална хранителна среда или в условия на *t*-ButOОН индуциран оксидативен стрес; \*\*\* $p < 0.001$  и \*\* $p < 0.01$  спрямо C; ## $p < 0.01$  спрямо M 0.3 и M 0.6; aa $p < 0.01$  спрямо Et 1.25; bb $p < 0.001$  спрямо M 1.25



**Фиг. 6.** Експресия на гена за GPx-4 в 3T3-L1 преадипоцити, третирани с нарастващи концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* или етанол, в нормална хранителна среда или в условия на *t*-ButOОН индуциран оксидативен стрес; \*\*\* $p < 0.001$  C; ### $p < 0.001$  спрямо M 0.3+tB; && $p < 0.01$  спрямо M 0.6+tB; aa $p < 0.01$  спрямо tB; b $p < 0.05$  спрямо Et 1.25+tB

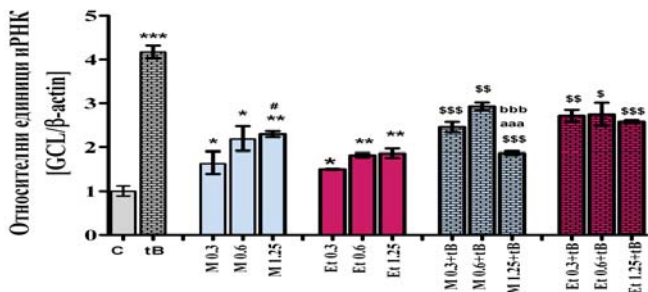
Прилагането на 100  $\mu$ M *t*-ButOОН доведе до индуциране на експресията на ензима, при това в значителна степен (близо три пъти) спрямо групата нетретирани клетки. Претретирание с етанолов извлек на *M. nigra*

в концентрации 0,3% и 0,6% и последващо прилагане на t-ButOОН също доведе до увеличение на нивото на генна експресия на GCL в сравнение с нетретираната контрола, докато извлекът в концентрация от 1,25% значително понижи индуцираната от оксиданта генна експресия. Подобен беше ефектът и на трите концентрации етанол.

Нито извлекът (M 0.3, M 0.6 и M 1.25), нито контролата етанол повлияха експресията на гена за GPx-4 в 3T3-L1 преадипоцити (фиг. 6). При третирането с t-ButOОН беше отчетено значимо повишение в нивата на иРНК за ензима спрямо контролната група ( $p < 0.001$ ). В клетките третирани с M 0.3 и M 0.6 и последващо прилагане на оксидант бяха установени нивата на иРНК за GPx-4 близки до тези в контролата за оксидативен стрес (tB група). Най-високата концентрация на извлека (група M1,25 + tB), приложена в оксидативно стимулирани преадипоцити, доведе до понижаване индуцираната от оксиданта генна експресия за GPx-4 ( $p < 0.01$ ). Не беше отчетена статистически значима разлика в нивата на експресия на GPx-4 в клетките третирани с етанол в сравнение с контролата нетретираните клетки (група C).

#### **4.1.2. Влияние върху транскрипционните нива на GCL и GPx-4 при J774A.1 макрофаги в условия на индуциран оксидативен стрес**

Промените в транскрипционните нива на антиоксидантния ензим GCL в J774A.1 макрофаги, в присъствие и отсъствие на оксидативен агент, са представени на фигура 7. При прилагане на трите концентрации на извлека на дървесина на черница и съответните концентрации етанол, се отчита статистическо значимо повишение в степента на експресия на гена за GCL в не стимулираните с оксидант макрофаги, спрямо контролната група, като изразеността на ефекта зависи от концентрацията на извлека ( $p < 0.05$ ).



**Фиг. 7.** Експресия на гена за GCL в J774A.1 макрофаги, третирани с нарастващи концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* или етанол, в нормална хранителна среда или в условия на *t*-ButOОН индуциран оксидативен стрес; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.01$  и \* $p < 0.05$  спрямо C; SSS $p < 0.001$ ; SS $p < 0.01$  и S $p < 0.05$  спрямо *tB* # $p < 0.05$  спрямо M 0.3; aaa $p < 0.001$  спрямо Et 1.25+tB; bbb $p < 0.001$  спрямо M 0,3+tB и M 0,6+tB

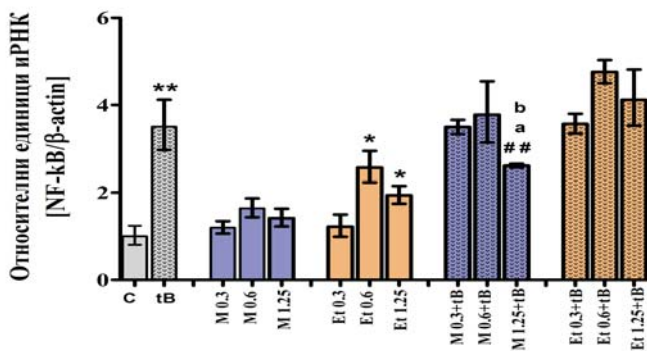
Третирането на макрофаги с *t*-ButOОН предизвика четирикратно увеличение в нивата на експресия на GCL спрямо контролната група клетки ( $p < 0.001$ ). При претретиране с извлека от дървесина на *M. nigra* и последващо прилагане на оксидант степента на индукция на ензима е значително по-ниска спрямо степента на индукция предизвикана само от оксиданта ( $p < 0.001$ ). Особено ясно изразен е този ефект при M 1,25+tB, където бяха отчетени по-ниски нива на иРНК, както в сравнение с двете по-ниски концентрации ( $p < 0.001$ ), така и по отношение на контролата етанол Et 1,25+tB ( $p < 0.001$ ).



## 4.2. Влияние върху транскрипционните нива на гени свързани с възпалителния отговор.

### 4.2.1. Влияние върху транскрипционните нива на NF-kB в условия на t-ButOОН индуциран оксидативен стрес

#### 4.2.1.1. Влияние върху транскрипционните нива на NF-kB при 3Т3-L1 преадипоцити

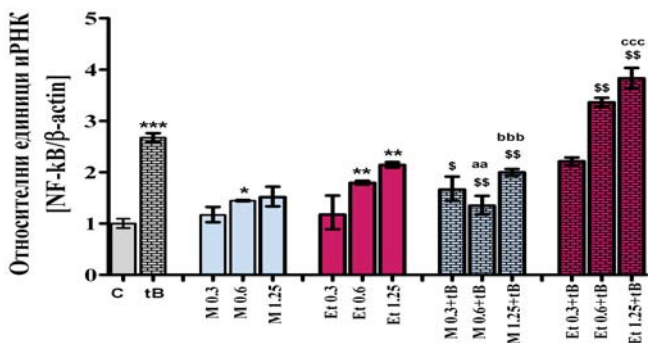


**Фиг. 8** Експресия на гена за NF-kB в 3Т3-L1 преадипоцити, третирани с нарастващи концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* или етанол, в нормална хранителна среда или в условия на t-ButOОН индуциран оксидативен стрес; \*\* $p < 0.01$  и \* $p < 0.05$  спрямо C; ### $p < 0.01$  спрямо M 0.3+tB и M 0.6+tB;  $p < 0.05$  спрямо tB;  $^b p < 0.05$  спрямо Et 1.25+tB

Нито една от изследваните концентрации на етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* не доведе до промяна в експресията на гена за NF-kB в преадипоцити, за разлика от контролните концентрации етанол, под чието действие бяха отчетени повишени нива на иРНК за гена спрямо нетретираниите клетки ( $p < 0.05$ ). Третирането с оксидант индуцира близо 4 пъти (\* $p < 0.01$ ) генната експресия на NF-kB (фиг.8). В модела на t-ButOОН индуциран оксидативен стрес единствено извлекът от *M. nigra* в концентрация от 1,25% доведе до понижаване транскрипционните нива на NF-kB (### $p < 0.01$ ), като бяха отчетени статистически значими разлики, както по отношение на ефекта на оксиданта ( $p < 0.05$ ), така и по отношение на

контролната концентрация етанол в присъствие на оксидант Et 1.25+tB ( $p<0.05$ ).

#### 4.2.1.2. Влияние върху транскрипционните нива на NF-kB при J774A.1 макрофаги



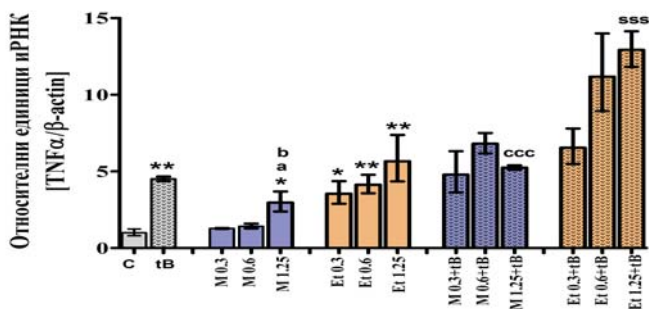
**Фиг. 9.** Експресия на гена за NF-kB в J774A.1 макрофаги, третирани с нарастващи концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* или етанол, в нормална хранителна среда или в условия на *t*-ButOОН индуциран оксидативен стрес; \*\*\* $p<0.001$ , \*\* $p<0.01$  и \* $p<0.05$  спрямо C; \$\$ $p<0.01$  спрямо tB; aa $p<0.01$  спрямо Et 0,6+tB; bbb $p<0.001$  спрямо Et 1.25+tB; ccc $p<0.001$  спрямо Et 0,3+tB

Резултатите от анализа на експресията на гена за NF-kB в макрофаги (фиг. 9) са сходни с тези отчетени в 3T3-L1 преадипоцити. В модела на *t*-ButOОН индуциран оксидативен стрес в макрофаги и трите изследвани концентрации на извлек от дървесина на черна черница понижават нивата на иРНК за NF-kB, както спрямо индуцираната от оксиданта експресия ( $p<0.01$ ), така и по отношение на контролните концентрации етанол (aa $p<0.01$ , bbb $p<0.001$ ).

## 4.2.2. Влияние върху транскрипционните нива на TNF $\alpha$ в условия на t-ButOОН индуциран оксидативен стрес

### 4.2.2.1. Влияние върху транскрипционните нива на TNF $\alpha$ при 3T3-L1 преадипоцити

При концентрация 1,25% в хранителна среда на извлек от дървесина на черница, беше отчетено статистическо значимо повишение на експресията на гена за TNF $\alpha$ , както спрямо контролната група ( $p < 0.05$ ), така и по отношение на двете по-ниски приложени концентрации М 0,3 и М 0,6 ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$ ) (фиг.10).

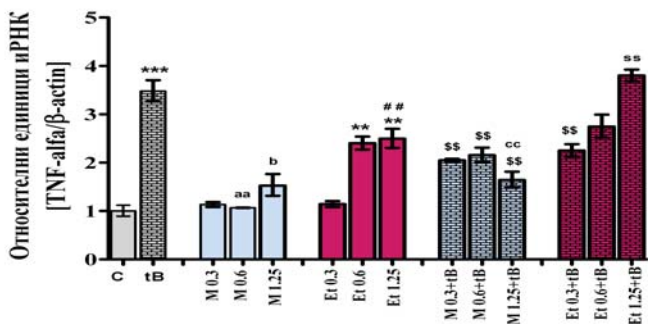


**Фиг. 10.** Експресия на гена за TNF $\alpha$  в 3T3-L1 преадипоцити, третирани с нарастващи концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* или етанол, в нормална хранителна среда или в условия на t-ButOОН индуциран оксидативен стрес; \*\* $p < 0.01$  и \* $p < 0.05$  спрямо C; <sup>a</sup> $p < 0.05$  спрямо М 0,3; <sup>b</sup> $p < 0.05$  спрямо М 0,6; <sup>ccc</sup> $p < 0.001$  спрямо Et 1,25+tB; <sup>sss</sup> $p < 0.001$  спрямо Et 1,25

Този ефект може да се дължи на самия екстаргент етанол, тъй като всички приложени концентрации етанол (групи Et 0.3, Et 0.6 и Et 1.25) повишават статистически значимо ( $p < 0.01$ ) нивата на иРНК за проинфламаторния цитокин TNF $\alpha$  спрямо контролната група клетки. Още повече, че окислителят и етанолът, приложени съвместно, проявяват кумулативен стимулиращ ефект (три пъти повече спрямо самостоятелното действие на t-ButOОН) върху нивата на иРНК за TNF $\alpha$  ( $p < 0.001$ ). Най-високата приложена концентрация на извлекта проявява значителен потенциал за инхибиране на експресия на TNF $\alpha$ , индуцираната от оксиданта (М 1,25+tB) в

сравнение със съответната контрола третиран с етанол клетки (група Et 1,25+tB).

#### 4.2.2.2. Влияние върху транскрипционните нива на TNF $\alpha$ при J774A.1 макрофаги



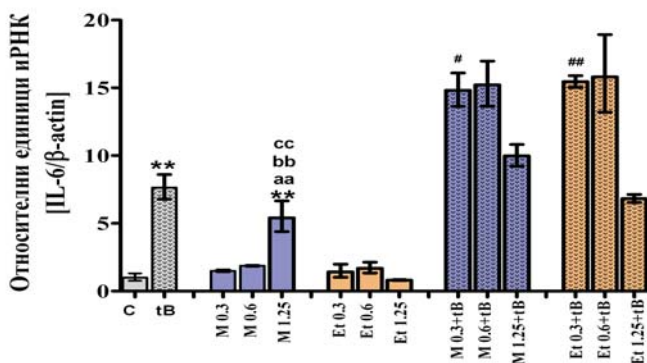
**Фиг. 11.** Експресия на гена за TNF $\alpha$  в J774A.1 макрофаги, третиран с нарастващи концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* или етанол, в нормална хранителна среда или в условия на *t*-ButOОН индуциран оксидативен стрес; \*\*\* $p < 0.001$  и \*\* $p < 0.01$  спрямо C; ss $p < 0.01$  спрямо tB; aa $p < 0.01$  спрямо Et 0,6; b $p < 0.05$  спрямо Et 1,25 cc $p < 0.01$  спрямо Et 1,25+tB; \* $p < 0.01$  спрямо Et 0,3+tB; ## $p < 0.01$  спрямо Et 0,3

Резултатите от анализа на ниво генна експресия на провъзпалителния цитокин TNF $\alpha$  в макрофаги (фиг. 11) са сходни с експресията на гена в 3T3-L1 преадипоцити. Важно е да се отбележи, че макрофагите демонстрират по-слаба чувствителност по отношение третирането с оксидант в комбинация оксидант с етанол. Беше установено, че експресия на TNF $\alpha$  при J774A.1 клетки, претретиран с Et 1,25 са близки до тези при групата клетки третиран с оксидант, докато при преадипоцитите нивата на експресия на цитокина при същите услови се увеличават три пъти повече спрямо самостоятелното приложения *t*-ButOОН. Подобно на ефекта при преадипоцити, извлекът от *M. nigra* в концентрация 1,25%, инхибира оксидативно-индуцираната експресия на TNF $\alpha$ , като беше установена статистическа значимост спрямо *t*-ButOОН ( $p < 0.01$ ). Ефектът на извлека се потвърждава и при сравнение с клетките третиран със същата концен-

трация етанол в присъствие на оксидант Et 1,25+tB ( $p<0.01$ ).

#### 4.2.3. Влияние върху транскрипционните нива на IL-6 при ЗТЗ-L1 преадипоцити в условия на индуциран оксидативен стрес

В клетките, третирани с най-високата концентрация на извлека (M 1,25) бяха установени значително увеличени транскрипционни нива на IL-6, както в сравнение с клетките третирани с двете по-ниски концентрации ( $p<0.01$ ), така и спрямо нетретирани контроли ( $p<0.01$ ) и третирани с Et 1,25 клетки ( $p<0.01$ ) (фиг. 12).

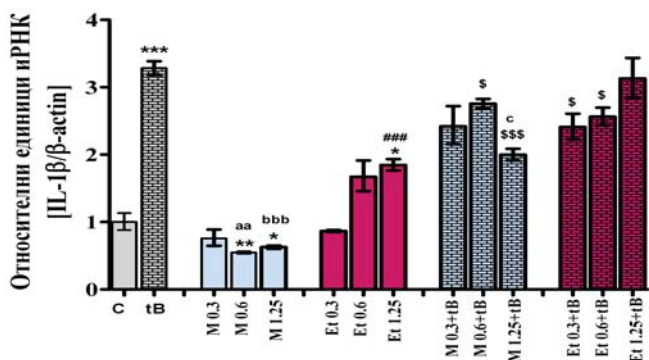


**Фиг. 12.** Експресия на гена за IL-6 в ЗТЗ-L1 преадипоцити, третирани с нарастващи концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* или етанол, в нормална хранителна среда или в условия на t-ButOОН индуциран оксидативен стрес; \*\* $p<0.01$  спрямо C; ## $p<0.01$ спрямо tB; # $p<0.05$  спрямо tB; aa $p<0.01$  спрямо M 0,3; bb $p<0.01$  спрямо M 0,6; cc $p<0.01$  спрямо Et 1,25

Прилагането на 100  $\mu$ M t-ButOОН доведе до индуциране на експреси-ята на IL-6 в ЗТЗ-L1 клетки, при това в значителна степен спрямо групата нетретирани контроли ( $p<0.01$ ). Претретирание с етанолов извлек на *M. nigra* в концентрации 0,3% и 0,6% и последващо прилагане на t-ButOОН също предизвика увеличение на нивото на генна експресия на цитокина в сравнение с контролната група и два пъти повече спрямо самостоятелно приложения t-ButOОН ( $p<0.05$ ). Подобен беше ефектът и на трите кон-центрации етанол.

#### 4.2.4. Влияние върху транскрипционните нива на IL-1 $\beta$ при J774A.1 макрофаги в условия на индуциран оксидативен стрес

В условия на оксидативен стрес, при макрофаги бяха установени многократно по-високи нива на IL-1 $\beta$  в сравнение с нетретираната контрола ( $p < 0,001$ ) (фиг. 13). Претретирането с извлека в концентрации 0,6% и 1,25%, при индуциран оксидативен стрес, доведе до понижаване експресията на провъзпалителния цитокин в сравнение с групата tB ( $p < 0,001$ ).

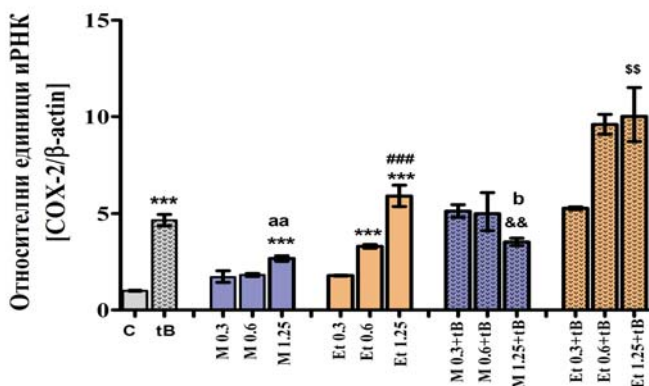


**Фиг. 13.** Експресия на гена за IL-1 $\beta$  в J774A.1 макрофаги, третираны с нарастващи концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* или етанол, в нормална хранителна среда или в условия на t-ВитООН индуциран оксидативен стрес; \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  и \* $p < 0,05$  спрямо C; \$\$\$ $p < 0,001$  и \$ $p < 0,05$  спрямо tB; aa $p < 0,01$  спрямо Et 0,6; bbb $p < 0,01$  спрямо Et 1,25; ###  $p < 0,001$  спрямо Et 0,3; ° $p < 0,5$  спрямо Et 1,25+tB

При концентрации 0,6% и 1,25% на извлека в хранителната среда, беше установено статистически значимо понижаване на експресията на IL-1 $\beta$ , както спрямо контролата нетретираны клетки ( $p < 0,01$  за M 0,6), така и спрямо контролните групи етанол ( $p < 0,001$  за M 1,25). Нивата на иРНК за IL-1 $\beta$  индуцираны от Et 1,25 бяха многократно по-високи в сравнение с клетките третираны с M 1,25 ( $p < 0,001$ ).

#### 4.2.5. Влияние върху транскрипционните нива на провъзпалителните ензими COX-2 и iNOS в условия на индуциран оксидативен стрес

##### 4.2.5.1. Влияние върху транскрипционните нива на COX-2 при 3T3-L1 преадипоцити



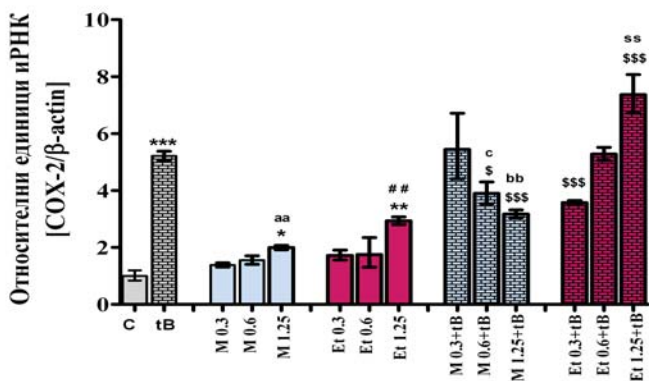
**Фиг. 14.** Експресия на гена за COX-2 в 3T3-L1 преадипоцити, третирани с нарастващи концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* или етанол, в нормална хранителна среда или в условия на *t*-ButOОН индуциран оксидативен стрес; \*\*\* $p < 0.001$  спрямо C; <sup>b</sup> $p < 0.05$  спрямо tB; ###  $p < 0.001$  спрямо Et 0,3 и 0,6; <sup>aa</sup> $p < 0.01$  спрямо Et 1,25; <sup>&&</sup> $p < 0.01$  спрямо Et 1,25+tB; <sup>ss</sup> $p < 0.01$  спрямо tB

При проследяване на ефекта на етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* върху експресията на COX-2 в 3T3-L1 клетъчна линия показва, че самият извлек в концентрация 1,25% стимулира експресията на ензима в сравнение с контролата нетретирани клетки ( $p < 0,001$ ). Възможно е този ефект може да се дължи на самия етанол като екстаргент, тъй като нивата на иРНК за COX-2 в клетки третирани с контролата Et 1.25 бяха повишени многократно ( $p < 0,01$ ) спрямо групата клетки третирани с M 1,25 ( $p < 0,001$ ) (фиг.14). При претретиране с M 1,25 и последващо прилагане на *t*-ButOОН беше отчетено понижаване в нивата на експресията на COX-2 спрямо оксиданта ( $p < 0,05$ ) и много по-значимо по отношение на експресията в клетките третирани с контролата етанол Et 1,25 +tB ( $p < 0,01$ ). Тъй като самият етанол е индуктор на оксидативен стрес, нивата на експресия

на прооксидантния ензим в клетките третирани с Et 1,25 +tB са увеличени в сравнение с клетките третирани с t-ButOОН самостоятелно ( $p<0.01$ ). Инхибиторният ефект на изследвания извлек по отношение транскрипционните нива на ензима в условия на индуциран оксидативен стрес, беше подчертан и в сравнение с контролната концентрация етанол (Et 1,25 +tB).

#### 4.2.5.2. Влияние върху транскрипционните нива на COX-2 при J774A.1 макрофаги

Резултатите от анализа на нивото на генна експресия на провъзпалителния ензим COX-2 в макрофаги са представени на фигура 15. Трябва да се отбележи, че макрофагите демонстрират по-слаба чувствителност по отношение съвместното третиране с оксидант и етанол (Et 1,25+tB) спрямо същия модел при преадипоцити. Подобно на ефекта при преадипоцити извлекът на *M. nigra* (M 1,25+tB) инхибира индуцираната от оксиданта ( $p<0.001$ ) и контролата Et 1,25 +tB ( $p<0.01$ ) генна експресия на COX-2.

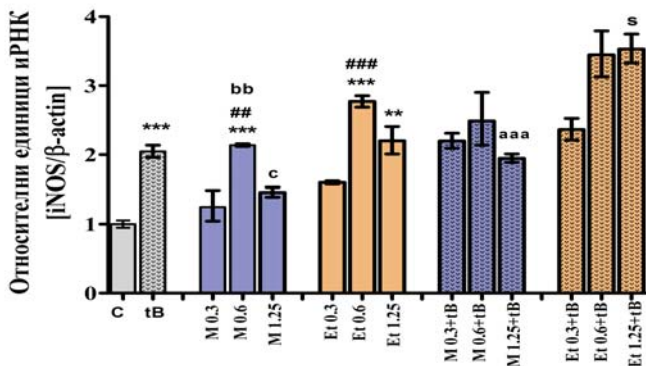


**Фиг. 15.** Експресия на гена за COX-2 в J774A.1 макрофаги, третирани с нарастващи концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* или етанол, в нормална хранителна среда или в условия на t-ButOОН индуциран оксидативен стрес; \*\*\* $p<0.001$ , \*\* $p<0.01$  и \* $p<0.05$  спрямо C; \$\$\$ $p<0.01$  спрямо tB; aa $p<0.01$  спрямо Et 1,25; bb $p<0.01$  спрямо Et 1,25+tB; ° $p<0.05$  спрямо Et 0,6+tB; ##  $p<0.01$  спрямо Et 0,3; ss $p<0.01$  спрямо Et 0,3+tB



#### 4.2.5.3. Влияние върху транскрипционните нива на iNOS при 3T3-L1 преадипоцити

Резултатите от анализа на генната експресия на iNOS показаха индуциращ ефект при третиране с М 0,6 и Et 0,6 в преадипоцити, като стойностите за иРНК бяха близки до тези индуцирани в клетките третирани с t-ButOОН (фиг. 16). От друга страна нивата на иРНК за ензима при групата М 1,25 са близки до стойностите на нетретираните клетки и значително по-ниски от контролната група Et 1,25 ( $p < 0.05$ ). В условия на оксидативен стрес (М 1,25+tB) извлекът инхибира генна експресията на прооксидантния ензим, индуцирана както от t-ButOОН, така и от съответната концентрация етанол приложен с оксидант (Et 1,25+tB) ( $p < 0.001$ ).

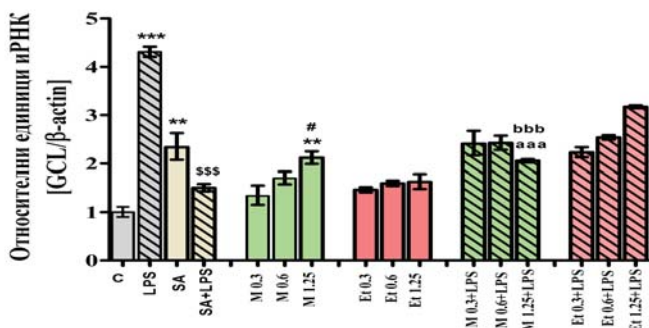


**Фиг. 16.** Експресия на гена за iNOS в 3T3-L1 преадипоцити, третирани с нарастващи концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* или етанол, в нормална хранителна среда или в условия на t-ButOОН индуциран оксидативен стрес; \*\*\*  $p < 0.001$  и \*\*  $p < 0.01$  спрямо C; ###  $p < 0.001$  спрямо Et 0,3 и 1,25; #  $p < 0.01$  спрямо M 0,3 и 1,25; aaa  $p < 0.001$  спрямо Et 1,25+tB; §  $p < 0.05$  спрямо Et 0,3+tB; <sup>bb</sup> $p < 0.01$  спрямо Et 0,6; <sup>c</sup> $p < 0.05$  спрямо Et 1,25

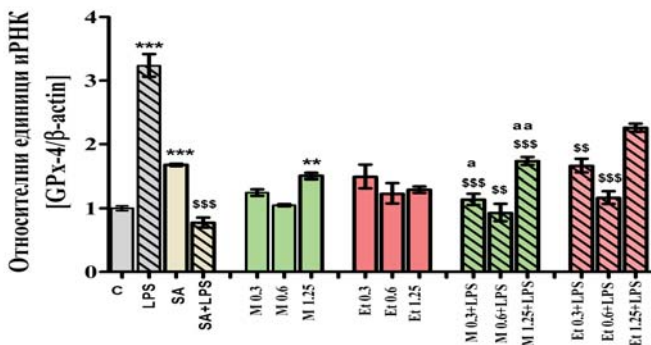
## 5. Изследване на противовъзпалителното действие на етанолов извлек от *M. nigra* при клетъчни култури в модел на LPS-индуцирано възпаление.

### 5.1. Влияние върху транскрипционните нива на ензими свързани с оксидативния статус GCL и GPx-4

При групата клетки, третирани с индуктор на възпаление, нивата на иРНК на двата ензима се повишиха повече от три пъти. При това промяната е статистически значима ( $p < 0,001$ ) спрямо нетретираните контроли (фиг.17 и 18).



**Фиг. 17.** Експресия на гена за GCL в J774A.1 макрофази, третирани с нарастващи концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* или етанол, в нормална хранителна среда или в условия на LPS индуцирано възпаление; \*\*\* $p < 0.001$  и \*\* $p < 0.01$  спрямо C; sss $p < 0.001$  спрямо LPS; aaa $p < 0.001$  спрямо Et 1,25+LPS; bbb $p < 0.001$  спрямо LPS; #  $p < 0.05$  спрямо M 0,3



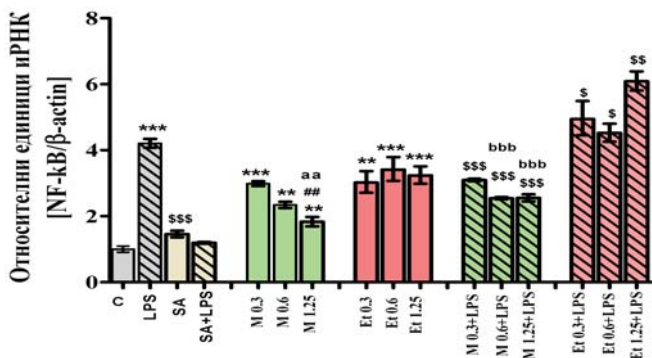
**Фиг. 18.** Експресия на гена за GPx-4 в J774A.1 макрофаги, третирани с нарастващи концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* или етанол, в нормална хранителна среда или в условия на LPS индуцирано възпаление ; \*\*\* $p < 0.001$  и \*\* $p < 0.01$  спрямо C; SSS $p < 0.001$  и SS $p < 0.01$  спрямо LPS ; aa $p < 0.01$  спрямо Et 1,25+LPS; a $p < 0.05$  спрямо Et 0,3+LPS

Най-високата концентрация на извлека (1,25%) индуцира най-силно транскрипцията и на двата ензима ( $p < 0,01$ ), спрямо нетретираната контрола, със стойности близки до групата клетки третирани с позитивната контрола SA. Не беше отчетена статистически значима промяна в генната експресия на GCL и GPx-4 при клетките третирани с контролните концентрации етанол. При групите клетки, претретирани с нарастващи концентрации на извлека от черница в условия на индуцирано възпаление (групи M+LPS), транскрипционните нива и на двата ензима бяха значително по-ниски и съизмерими с позитивната контрола в сравнение с LPS третираната контролна група. Трябва да бъде отчетен фактът, че в условия на индуцирано възпаление, извлекът от черница в концентрация 1,25% значително понижава LPS-индуцирана експресия на изследваните гени, сравнено със съответната контролна концентрация етанол.

## **5.2. Влияние върху транскрипционните нива на гени свързани с възпалителния отговор**

### **5.2.1. Влияние върху транскрипционните нива на NF-κB**

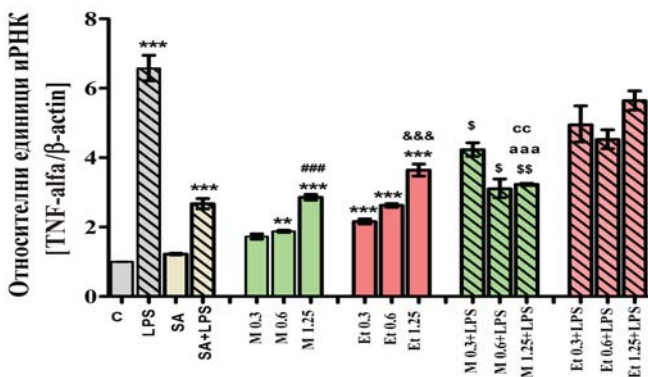
Третирането на макрофаги с LPS доведе до значително стимулиране на генната експресия на NF-κB в сравнение с нетретираната контрола ( $p < 0.001$ ) (фиг. 19). Извлекът от дървесина на черна черница също прояви стимулиращо действие върху експресията на изследвания ген спрямо контролата нетретирани клетки. От фигурата е видно, че този ефект на извлека е обратно пропорционален на концентрацията, в която е приложен ( $p < 0,01$ ). И трите контролни концентрации етанол стимулираха експресията на гена ( $p < 0.01$ ), но при тези групи не беше установена концентрационна зависимост. Позитивната контрола салицилова киселина, приложена самостоятелно, не оказва влияние върху транскрипционните нива на NF-κB, докато в LPS стимулираните макрофаги прояви инхибиращ ефект и понижи нивата на иРНК до стойности съизмерими с тези в нетретираните контроли ( $p < 0.001$ ). Подобно на салициловата киселина, извлекът от дървесина на черница прояви инхибиращо действие върху генната експресия на NF-κB, в сравнение с LPS третираните клетки и още по-изразено, спрямо контролните групи етанол ( $p < 0.001$ ). Беше отчетен кумулативен стимулиращ ефект върху експресията на NF-κB при едновременно третиране на клетките с етанола и индуктура на възпаление.



**Фиг. 19.** Експресия на гена за NF-kB в J774A.1 макрофаги, третирани с нарастващи концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. pigra* или етанол, в нормална хранителна среда или в условия на LPS индуцирано възпаление; \*\*\* $p < 0.001$  и \*\* $p < 0.01$  спрямо C; sss $p < 0.001$ , ss $p < 0.01$  и s $p < 0.05$  спрямо LPS; aa $p < 0.01$  спрямо Et 1,25; ## $p < 0.01$  спрямо M 0,3; bbb $p < 0.001$  спрямо Et+LPS

### 5.2.2. Влияние върху транскрипционните нива на TNF $\alpha$

Имайки предвид получените резултати относно промяната на генната експресия на NF-kB и фактът, че TNF $\alpha$  е мощен проинфламаторен цитокин, то отчетеното многократно увеличение на експресията на белтъка при макрофаги третирани с индуктор на възпаление е съвсем логично (фиг. 20). Извлекът от дървесина на черница също индуцира експресията на белтъка, като беше отчетена и концентрационна зависимост на ефекта ( $p < 0.001$  спрямо контролата нетритирани клетки). Съответните контролни концентрации етанол имаха подобен, но значимо по-подчертан ефект ( $p < 0.001$ ). В модела на индуцирано възпаление претритирането с M 1,25 понижи транскрипционните нива на TNF $\alpha$ , както спрямо индуктора на възпаление ( $p < 0.01$ ), така и спрямо контролната концентрация етанол ( $p < 0.001$ ). Този ефект е право пропорционален на приложената концентрация ( $p < 0.01$ ).

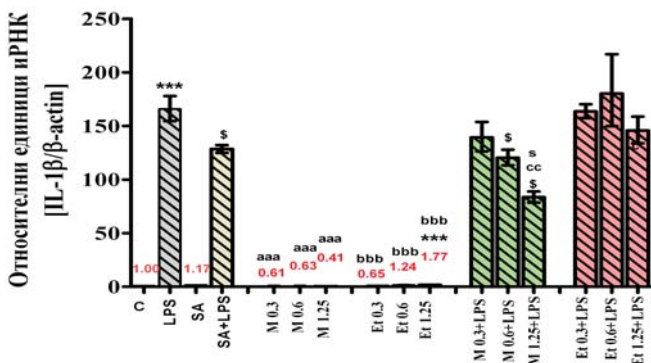


**Фиг. 20.** Експресия на гена за TNF $\alpha$  в J774A.1 макрофаги, третирани с нарастващи концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* или етанол, в нормална хранителна среда или в условия на LPS-индуцирано възпаление; \*\*\* $p < 0.001$  и \*\* $p < 0.01$  спрямо C; \$\$\$ $p < 0.001$ , \$\$\$ $p < 0.01$  и \$\$\$ $p < 0.05$  спрямо LPS; ###  $p < 0.001$  спрямо M 0,3 и M 0,6; &&&  $p < 0.001$  спрямо Et 0,3 и M 0,6; \$\$\$ $p < 0.001$  спрямо Et 1,25+LPS; \$\$\$ $p < 0.01$  спрямо M 0,3+LPS

### 5.2.3. Влияние върху транскрипционните нива на IL-1 $\beta$

IL-1 $\beta$  е сред основните цитокини отговорни за острата фаза на възпалителния отговор. Под действие на LPS в макрофагите беше отчетено значително стимулиране експресия на гена за IL-1 $\beta$  (до 170 пъти) спрямо контролата ( $p < 0,001$ ) (фиг.21). Салициловата киселина, приложена в условия на LPS-индуцирано възпаление прояви инхибиращ ефект върху експресията на цитокина ( $p < 0,05$ ).

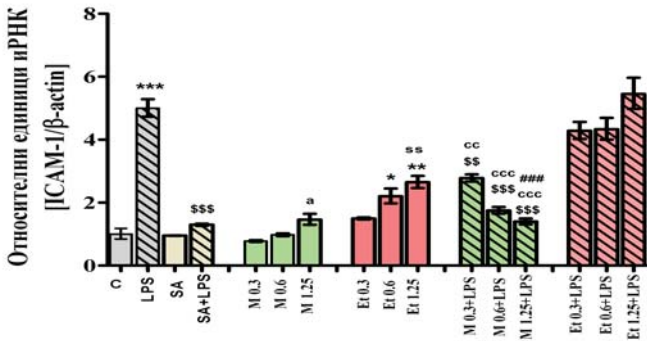
И трите приложени концентрации от извлека на дървесина не доведоха до повишаване на експресията на белтъка, спрямо контролата нетретирани клетки, докато контролата етанол в концентрация 1,25% повиши нивата на иРНК за IL-1 $\beta$  статистически значимо ( $p < 0,001$ ). Претретирането с 1,25% от извлека имаше изключително силно инхибиращо действие върху генната експресия на IL-1 $\beta$ , дори по-подчертано от позитивната контрола и два пъти повече ( $p < 0,01$ ) от съответната контролна концентрация етанол.



**Фиг. 21.** Експресия на гена за *IL-1β* в *J774A.1* макрофаги, третирани с нарастващи концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* или етанол, в нормална хранителна среда или в условия на *LPS* индуцирано възпаление; \*\*\* $p < 0.001$  спрямо C; \$ $p < 0.05$  спрямо LPS; aaa $p < 0.001$  спрямо M+LPS; bbb $p < 0.001$  спрямо Et+LPS; <sup>c</sup> $p < 0.01$  спрямо Et 1,25+LPS; <sup>s</sup> $p < 0.05$  спрямо M 0,3+LPS

#### 5.2.4. Влияние върху транскрипционните нива на интрацелуларния адхезионен протеин (ICAM-1)

Беше отчетена експресия на гена за ICAM-1 в *LPS* третираната група, многократно по-силна, отколкото в контролната група нетретирани клетки ( $p < 0,001$ ). Трите концентрации извлек от дървесина на черница не повлияха генната експресия на ICAM-1 и в тези групи нивата на иРНК за гена останаха по-ниски или съизмерими с тези в нетретираните контроли. От друга страна контролната концентрация етанол Et 1,25 повиши нивата на иРНК за белтъка, както спрямо нетретираните клетки ( $p < 0,01$ ), така и спрямо по-ниските концентрации ( $p < 0,01$ ). Резултатите са представени на фигура 22. От фигурата е видно, че при претретиране с извлека, в условия на възпаление (група M +LPS) генната експресия на ICAM-1 се е понижала с нарастване на приложената концентрация ( $p < 0,001$ ), докато при клетките третирани с контролните концентрации етанол не бе отчетена промяна в експресията спрямо групата клетки третирани само с *LPS*.

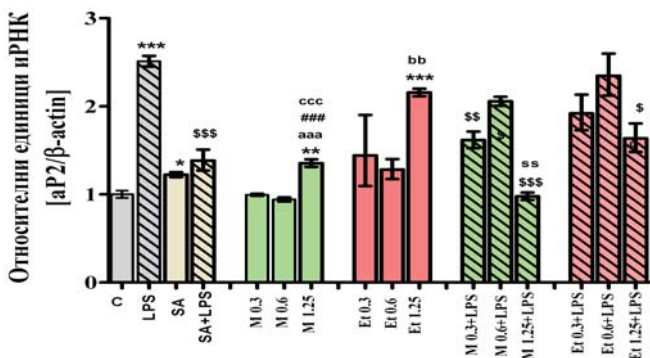


**Фиг. 22.** Експресия на гена за ICAM-1 в J774A.1 макрофаги, третиран с нарастващи концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* или етанол, в нормална хранителна среда или в условия на LPS индуцирано възпаление; \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  и \* $p < 0.05$  спрямо C; \$\$\$ $p < 0.001$  и \$\$ $p < 0.01$  спрямо LPS; # $p < 0.05$  спрямо Et 1,25; \$ $p < 0.01$  спрямо Et 0,3; ### $p < 0.001$  спрямо M 0,3+LPS; ccc $p < 0.001$  и cc $p < 0.01$  спрямо Et+LPS

### 5.2.5. Влияние върху транскрипционните нива на цитоплазмения ВМК свързващ протеин aP2 (FABP4)

Генът за aP2 се експресира както в адипоцити, така и в макрофаги и е един от новите маркери за липиден метаболизъм и възпаление. На фигура 23 са представени резултатите от влиянието на извлека от дървесина на черница върху експресията на aP2 в нормални условия на култивиране или при индуцирано възпаление. В клетките третиран с LPS, експресията на гена се увеличи значително спрямо нетретираните контроли ( $p < 0,001$ ). Транскрипционните нива на aP2 се повишиха и при клетките третиран с M 1,25, но този ефект може да се отдаде на самия екстаргент етанол, който, приложен в същата концентрация самостоятелно, значително повишава нивата на експресия на белтъка ( $p < 0,001$  спрямо контролата). Още повече, в клетките с индуцирано възпаление, най-високата концентрация на извлека на черница проявява значителен потенциал за инхибиране на индуцираната от LPS експресия ( $p < 0.001$ ), като отчетените стойности за иРНК са близки до базовите нива. При контролната концентрация етанол Et 1,25 не бе отчетена такава зависимост.

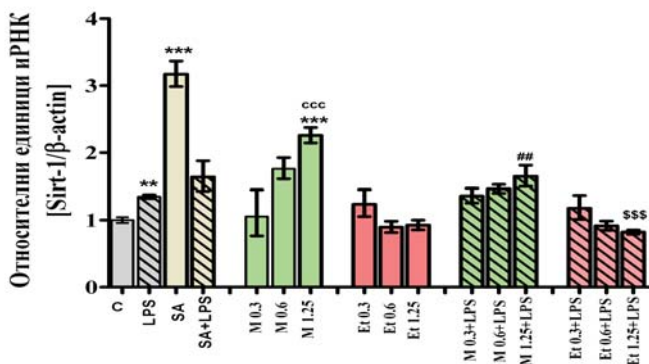




**Фиг. 23.** Експресия на гена за aP2 в J774A.1 макрофаги, третирани с нарастващи концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. pigra* или етанол, в нормална хранителна среда или в условия на LPS индуцирано възпаление; \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  и \* $p < 0.05$  спрямо C; \$\$\$ $p < 0.001$ , \$\$ $p < 0.01$  и \$ $p < 0.05$  спрямо LPS; aaa $p < 0.001$  спрямо Et 1,25; bb $p < 0.01$  спрямо Et 0,3; ### $p < 0.001$  спрямо M 0,3 и M 0,6; ccc $p < 0.001$  спрямо Et 1,25; \$ $p < 0.01$  спрямо Et 1,25+LPS

## 5.2.6. Влияние върху транскрипционните нива на Sirt-1

Промяната в нивата на генна експресия на НАД+ зависимата деацетилаза Sirt-1 в модел на индуцирано възпаление са представени на фигура 24. Третирането с LPS не доведе до промяна в транскрипционните нива на белтъка, докато при клетките претретирани със салицилова киселина и M 1,25 бе отчетено статистически значимо повишаване експресията на изследвания ген ( $p < 0.001$  спрямо контролата нетретирани клетки). Освен, че самият извлек от дървесина на черница приложен самостоятелно в концентрация 1,25% индуцира експресията на Sirt-1 същият ефект беше наблюдаван и в модела на LPS индуцирано възпаление, където извлекът повиши нивата на иРНК до стойности, сходни с тези отчетени при клетките третирани с позитивната контрола (група SA). Този стимулиращ ефект на извлека беше потвърден и при сравнение с контролната концентрация етанол (група Et 1,25 +LPS).



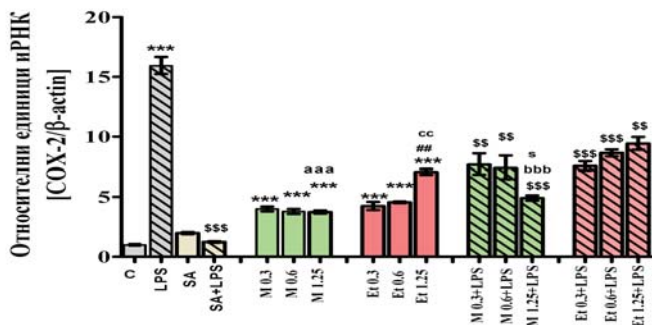
**Фиг. 24.** Експресия на гена за *Sirt-1* в *J774A.1* макрофаги, третирани с нарастващи концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* или етанол, в нормална хранителна среда или в условия на *LPS* индуцирано възпаление; \*\*\* $p < 0.001$  и \*\* $p < 0.01$  спрямо *C*; sss $p < 0.001$  спрямо *LPS*; ccc $p < 0.001$  спрямо *Et 1,25*; ##  $p < 0.01$  спрямо *Et 1,25+LPS*

### 5.3. Влияние върху транскрипционните нива на провъзпалителните ензими *COX-2* и *iNOS* в условия на *LPS*-индуцирано възпаление

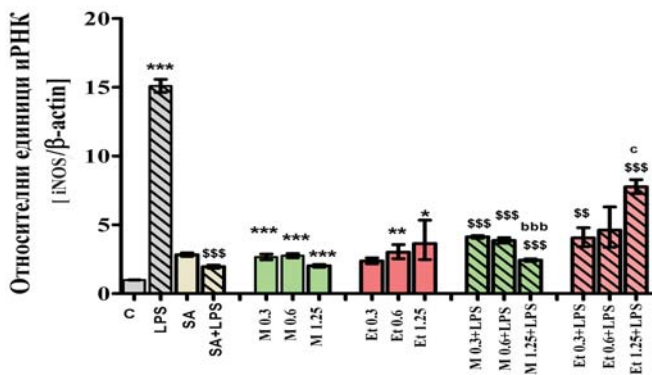
Резултатите от анализа на генната експресия на *COX-2* и *iNOS* в *J774A.1* макрофаги са представени на фигури 25 и 26, съответно.

Беше установено, че при третиране на клетките с индуктор на възпаление експресията и на двата ензима се индуцира многократно спрямо нетретираната контрола ( $p < 0.001$ ). От данните представени на фигура 25 се вижда, че транскрипционните нива на *COX-2* са повишени значително в клетките третирани с извлек от дървесина на черница ( $p < 0.001$ ), но в много по-ниска степен спрямо контролните концентрации етанол ( $p < 0.001$ ). Бяха отчетени нива на иРНК за *iNOS*, близки до стойностите на позитивната контрола при клетките третирани с извлек (фиг. 26). В условия на индуцирано възпаление *M 1.25* значително понижи *LPS* индуцираната експресия на *COX-2* ( $p < 0.001$ ), при това два пъти повече спрямо контролната концентрация етанол ( $p < 0.001$ ). По-силно изразен е този ефект по отношение генната експресия на *iNOS*. Прилагането на извлек

на дървесина, в концентрация 1,25% в хранителна среда, доведе до понижени нива на генната експресия на iNOS, както спрямо индуктура на възпаление, така и спрямо контролните концентрации етанол ( $p < 0.001$ ).



**Фиг. 25.** Експресия на гена за COX-2 в J774A.1 макрофаги, третирани с нарастващи концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. pigra* или етанол, в нормална хранителна среда или в условия на LPS индуцирано възпаление; \*\*\* $p < 0.001$  спрямо C; SSS $p < 0.001$  и SS $p < 0.01$  спрямо LPS; aaa $p < 0.001$  спрямо Et 1,25; bbb $p < 0.001$  спрямо Et 1,25 +LPS; ## $p < 0.01$  спрямо Et 0,3; cc  $p < 0.01$  спрямо Et 0,6; \* $p < 0.05$  спрямо M 0,6+LPS

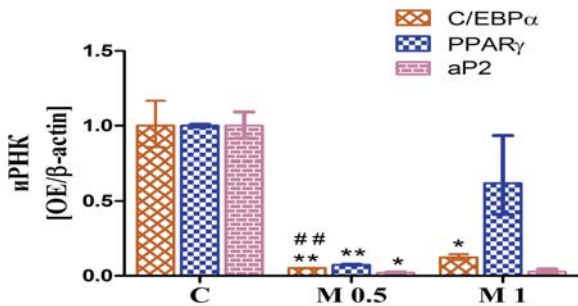


**Фиг. 26.** Експресия на гена за iNOS в J774A.1 макрофаги, третирани с нарастващи концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. pigra* или етанол, в нормална хранителна среда или в условия на LPS индуцирано възпаление; \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  и \* $p < 0.05$  спрямо C; SSS $p < 0.001$  и SS $p < 0.01$  спрямо LPS; bbb $p < 0.001$  спрямо Et 1,25+LPS; c $p < 0.05$  спрямо Et 0,3+LPS и Et 0,6+LPS

## 6. Изследване на антиобезитния потенциал на етанолов извлек от *M. nigra* в диференцирани адипоцити

### 6.1. Влияние върху транскрипционните нива на гени свързани с липидния метаболизъм в мастна тъкан

Диференцирани 3T3-L1 преадипоцити до зрели адипоцити бяха третирани с две концентрации от изследвания извлек. Беше проследен ефектът му върху гени свързани с липидния метаболизъм C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$  и aP2. Данните са обобщени на фигура 27. Двете приложени концентрации значително инхибираха експресията на C/EBP $\alpha$  и aP2 в сравнение с контролата нетретирани клетки ( $p < 0.001$ ). Понижаване на нивата на иРНК за PPAR $\gamma$  бе отчетено само при клетките третирани с по-ниската концентрация на извлека (0,5 % крайно съдържание в хранителната среда). При сравняване ефектите на двете приложени концентрации се вижда, че M 0,5 има по-силно изразен инхибиращ ефект върху генната експресия на адипогенните транскрипционни фактори PPAR $\gamma$  и C/EBP $\alpha$  ( $p < 0.01$  спрямо M 1). От друга страна и двете концентрации на извлека инхибираха експресията на един от ключовите белтъци, участващи в адипогенезата, aP2.



**Фиг. 27.** Експресия на гените за PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  и aP2 в диференцирани адипоцити, третирани с различни концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. nigra*; Легенда: OE- относителни единици; \*\*\* $p < 0.001$  и \*\* $p < 0.01$  спрямо C; ##  $p < 0.01$  и # $p < 0.05$  спрямо M 1

## V. ДИСКУСИЯ

### Изследване на общото полифенолно съдържание и антиоксидантната активност на етанолови извлекци от дървесини на подбрани дървесни видове

Един от най-важните етапи при производството на високоалкохолни напитки е процесът на отлежаване и оцветяването им. По време на контакта с дървесината в алкохола се екстрахират различни нискомолекулни съединения, освободени от съответния дървесен вид, които от една страна подобряват цвета, вкуса и аромата на напитката, а от друга страна могат да променят нейното полифенолно съдържание и да повишат антиоксидантната ѝ активност (Alañón et al., 2011).

Според Спиров (1995), високо алкохолните напитки в България традиционно се складираат в бурета направени от летен дъб (*Quercus robur*) или бяла акация, салкъм (*Robinia pseudoacacia*).

Понякога при домашното производство, освен отлежаване в бурета, за оцветяване на ракията се използва дървесина от бяла или черна черница (*Morus alba*, *M. nigra*), салкъм (*Robinia pseudoacacia*), френски или български дъбов чипс и по-рядко (основно в Североизточна България) от смрадлика (*Cotinus coggygria*).

В настоящото изследване си поставихме за цел да проучим метаболитните ефекти на етанолов извлек от дървесина на един от изследваните дървесни видове. Това наложи предшествашо сравнително изследване на ОПС и промяната на АОА на етанолови извлекци от дървесини на четири растения, традиционно използвани в България за оцветяване и съхранение на високо алкохолни напитки.

При направения сравнителен анализ беше установено, че етаноловият извлек от дървесина на черница има многократно по-високи ОПС и АОА в сравнение с останалите изследвани видове. Подобни резултати са получени при сравнително изследване на 50% водно-етанолови екстракти от различни дървесни видове, при които най-високата ОПС се отчита в

екстракт от черница, следвано от акация и дъб (de Rosso et al., 2009).

Установеното от нас оптимално време за екстракция от 40 дни е в съответствие с резултатите на други български автори (Павлов и съавт., 2012), както и с традициите на българското население при оцветяване на ракия в домашни условия.

Разликата в антиоксидантната активност на изследваните етанолови извлекци се дължи на различния фитохимичен състава на дървесината. Според Alađón et al. (2011) наличието на фенолни киселини като галова, елагова и *p*-кумарова допринасят най-много за антиоксидантния капацитет на екстрактите от сърцевината на дървесината. Въпреки, че полифенолното съдържание на салкъм и смрадлика са много сходни, етаноловият извлек от дървесина на салкъм проявява по-висока АОА. Някои автори обясняват това с факта, че АОА на растителните екстракти може да се дължи не само и единствено на фенолните съединения, а също така и на други специфични вторични метаболити, притежаващи такава активност (Javanmardi et al., 2003).

При извършеното от нас изследване на фитохимичния състав беше установено, че съдържание на флавоноиди в етаноловите екстракти от дървесина на черница (504.91 и 471.03  $\mu\text{g QE/ml}$ ) е по-високо от съдържанието на танини в същите екстракти (94.13  $\mu\text{g GAE/ml}$ ). Получените от нас резултати са съпоставими с други подобни изследвания. Niratker and Singh (2014) установяват по-високо съдържание на флавоноиди (0.48  $\text{mg/ml}$ ) спрямо танини (0.35  $\text{mg/ml}$ ) в етанолов екстракт от листа на *Morus indica*. Sývacý and Sökmen (2004) установяват високо съдържание на флавоноида рутин в клони на черна черница. Полученият от нас резултат относно високото съдържание на танини (20.06  $\mu\text{g GAE/ml}$ ) и флавоноиди (14.39  $\mu\text{g QE/ml}$ ), обяснява проявената висока АОА на извлека. Доказано е, че танините са до 30 пъти по-ефективни при неутрализиране на хидроксилни радикали, в сравнение с други феноли (Hagerman et al. 1998). Въз основа на тези резултати авторите предполагат, че танини, които са идентифицирани в много растителни храни и напитки са едни от основните

биологични антиоксиданти.

Установената висока степен на корелация между ОПС и АОА при всички изследвани екстракти са в съгласие с докладваната от други автори зависимост между общото полифенолно съдържание и *in vitro* АОА на водно-алкохолни екстракти от различни растителни видове (Flamini et al. 2007; Иванова 2013; Киселова-Кънева 2011; Tosun et al. 2009; Moyer et al. 2002). Това потвърждава, че именно полифенолите са активните компоненти, допринасящи за АОА на изследваните извлекци. Сезонната промяна в ОПС в стебла на *M. nigra* и корелиращата с тях АОА е изследвана от Sývacý and Sökmen (2004). Авторите отчитат, че стеблата могат да произведат фитохимични компоненти, проявяващи по-силни антиоксидантни свойства спрямо другите части на растението, което се свързва с приспособяването на дървото към различен тип стрес.

Vicaş et al. (2011) провеждат изследване върху фитохимичния състав, АОА на екстракти от листа и клонона на различни растителни видове, както и върху влиянието на разтворителя използван за добиване на биологично активни вещества. Те установяват, че етаноловите екстракти имат по-изразен потенциал да инхибират пероксидни радикали, в сравнение с водните екстракти. Данните от изследване проведено от Koffi et al. (2010) показват, че етанолът е най-добрият разтворител за екстракция на феноли на 26 проучени растения.

Предполага се, че полифенолите могат да проявяват антиоксидантна активност по различни механизми. Най-добре проученият от тях е чрез неутрализирането на свободни радикали. Поради високата реактивност на хидроксилната група на фенолните съединения, те се окисляват от свободните радикали (Korkina and Afanasiev, 1997), при което се получават по-стабилни и по-слабо реактивни форми. Някои проантоцианидини проявяват антиоксидантен капацитет чрез регулация на генната експресия на ензими като GCL свързани с оксидативния статус (Stevanovic et al., 2009). Други възможни механизми на АОА са взаимодействията между полифенолните съединения с физиологични антиоксиданти (Fraga et al., 2010)

или чрез инхибиране на прооксидантни ензими, като ксантин оксидаза и азотен оксид синтаза (Selloum et al., 2001).

В заключение може да се приеме, че дървесините на изследваните растения са богати на полифенолни съединения и екстракцията им в етанола повлиява антиоксидантния капацитет на извлека.

### **Определяне влиянието на 40% водно-етанолов извлек от дървесина на *Morus nigra* върху жизнеността на клетъчни култури**

Първата стъпка при изследване биологичните ефекти на растителните екстракти е, да бъдат определени подходящи нетоксични концентрации за по-нататъшно прилагане в различни експериментални модели.

В нашето проучване приложихме МТТ тест за цитотоксичност, с цел установяване влиянието на 40% водно-етанолов извлек от дървесина на черница върху клетъчната жизненост и определяне на нетоксични концентрации, които могат да бъдат прилагани при по-нататъшни проучвания върху метаболитните ефекти на извлека.

При изследване влиянието на етанолов екстракт от дървесина на черна черница върху жизнеността на 3T3-L1 преадипоцити беше установено, че с нарастване на съдържанието на екстракта в диапазона от 0,15% до 2,5% се наблюдава увеличение на клетъчната жизненост повече от 100% спрямо контролата. В същото време контролният на извлека разтвор на етанол, приложен в същия диапазон на процентно съдържание, прояви нарастваща с концентрацията цитотоксичност. Тези резултати демонстрират цитопротективна и пролиферативна активност на извлека. Някои автори предполагат, че етанолът може да взаимодейства с клетъчни мембрани на клетки с много ниска способност да го метаболизират. Стимулирането на клетъчната пролиферация, след третирането, най-вероятно се дължи на активни компоненти екстрахирани в етанола от дървесината. При нарастване на процентното съдържание на изследвания извлек над 2,5% в хранителната среда, жизнеността започва плавно да намалява, но остава по-висока от тази на контролата етанол. Този ефект би могъл да се обясни



с проявата на токсични ефекти на някои от компонентите на извлека върху клетките. Подобни резултати са докладвани от Ardevol et al. (2000), които анализират действието на катехин, епикатехин и процианидин екстрахирани в етанол върху жизнеспособността на 3T3-L1 клетки при нарастващи концентрации от 50 до 300 mM в продължение на 24 часа. Цитотоксичното действие на растителни екстракти се обяснява със способността на някои фенолни съединения да инхибират клетъчното делене и да индуцират апоптоза (Yang et al., 2008).

При провеждане на МТТ тест с цел установяване на нетоксични концентрации, някои автори докладват за пролиферативен ефект на изследваните растителни екстракти. Метанолови и водни екстракти на растения, които се прилагат при лечение на диабет приложени в концентрации от 250-2000 µg/mL върху 3T3-A31, не повлияват жизнеността на клетките (Mahomoodally et al., 2012). Подобни изследвания са проведени и от български научни колективи при изследване цитопротективно действие на водни и водно-етанолни екстракти на растения с широко приложение в българската народна медицина (Киселова-Кънева 2011; Иванова 2013)

Може да се приеме, че изследваният от нас извлек от дървесина проявява цитопротективен ефект при двата типа клетъчни линии спрямо цитотоксичното действие на 40% етанол.

### **Влияние на етанолов извлек на *Morus nigra* върху транскрипционните нива на гени свързани с оксидативния статус в условия на оксидативен стрес и възпаление**

В настоящото изследване проучихме влиянието на етанолов извлек от дървесина на черна черница върху транскрипционните нива на гени свързани с метаболизма на пептида глутатион.

Промените в редокс потенциала на околната среда и по-специално баланса в редокс състоянието на глутатиона GSH/GSSG са свързани с етиологията и развитието на невродегенеративни, сърдечно-съдови, белодробни заболявания, възпалителни състояния а така също и заболявания

на имунната система, кистозна фиброза, рак и диабет (Csiszar et al., 2008). Обезвреждането на прооксидантите води до изчерпване на редуцирания GSH, което от своя страна намалява способността на клетките да реагират на стресови промени на средата. Богатите на полифеноли растителни екстракти също биха могли да намалят съотношението GSH/GSSG във връзка с изчерпването му в хода на тяхната биотрансформация. От друга страна, в ролята си на мощни екзогенни антиоксиданти, обезвреждайки АКФ продуцирани при нормалния метаболизъм на клетките, фенолните съединения могат да играят компенсаторна роля при състояния на оксидативен стрес.

Отчетените в настоящото изследване резултати показаха стимулиращ ефект на извлек от дървесина на черница върху експресията на гена за GCL, ефект особено изразен в преадипцити в сравнение макрофаги (фиг. 5 и фиг. 7). Отчетен беше и слаб стимулиращ ефект на етанола върху тази експресия при макрофаги, вероятно поради индуцирана продукция на АКФ. Подобен ефект на етанолов растителен екстракт е демонстриран по-рано в подобни изследвания върху клетъчни култури (Киселова, 2011). Получените в настоящото изследване резултати са в съответствие и с други изследвания, в които е установено, че полифенолите в растителни екстракти могат да индуцират експресията на гена за GCL Myhrstad et al. (2002). Вероятният механизъм, посредством който флавоноидите могат да проявят ARE/ErRE-опосредствано активиране на транскрипцията, е модифициране на взаимодействието между Keap1 и Nrf1 и Nrf2, освобождаване на транскрипционните фактори и транслокацията им в ядрото.

Въз основа на получените резултати може да се предположи, че високото съдържание на съединения с полифенолна природа в EIMN е причина за индукция на ензимната експресия, установена при третиране на 3T3-L1 и J774A.

При прилагане на оксидативен агент беше отчетено статистически значимо повишаване в транскрипционните нива както на GCL в 3T3-L1 преадипцити и J774A.1 макрофаги, така и на иРНК за GPx4 в преадипо-

цити (фиг.17 и фиг.18). Индуциране на експресията на GCL в условия на оксидативен стрес е установена и в други изследвания. Kobayashi et al. (2009) отчитат увеличени нива на иРНК за GCL в 3T3-L1 адипоцити третирани с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. В присъствието на оксидативен агент и индуктор на възпаление се увеличава продукцията на АКФ и с цел тяхното обезвреждане се индуцират ензими от вътреклетъчната антиоксидантна система, както се установява и в настоящия експеримент. В резултат на активирането на GPx4 се изчерпва вътреклетъчния GSH и с цел възстановяване на GSH/GSSG баланс се стимулира експресията на регулаторния ензим от синтеза на глутатион – GCL.

По-ниските нива на експресия на GCL и GPx4 при клетките третирани с извлек на дървесина и последващо с оксидант или LPS, могат да се обяснят с установената антиоксидантна активност на извлека (фиг. 2). Високото полифенолно съдържание (фиг. 1) вероятно допринася за обезвреждането на продуцираните свободни радикали и така вероятно компенсира до известна степен необходимостта от индуциране на вътреклетъчна АО защита, каквато се наблюдава при действието на t-ButOОН и LPS. Предварително активиране на редокс-сензитивни транскрипционни фактори показва, че при последваща радикалова продукция, клетката по-лесно може да се справи с възникналия оксидативен стрес (Тасинов, 2015).

Въз основа на получените резултати може да се направи заключение, че етаноловият извлек на дървесина на черна черница проявява антиоксидантна активност чрез модулация на генната експресия на ензими от метаболизма на глутатион или директно обезвреждане на АКФ.

### **Влияние на етанолов извлек на *M. nigra* върху транскрипционните нива на гени свързани с възпалителния отговор в условия на индуциран оксидативен стрес и възпаление**

Последни проучвания (Olefsky and Glass 2010) потвърждават ролята на възпалението като ключов фактор в проявата и развитието на сърдечно-съдови заболявания, диабет тип 2, затлъстяване и невродегенеративни

заболявания. Gupta et al. (2011) докладват възможната роля на куркумин, ресвератрол и ликопен за инхибиране на NF-κB активираната продукция на цитокини и последващото предотвратяване на системно възпаление. Други изследвания (Leiro et al., 2005) върху перитониални макрофаги стимулирани с LPS и гама интерферон, показват, че изомер на ресвератрол (С-ресвератрол), значително инхибира експресията на NF-κB таргетни гени като адхезионни молекули (MCP-1), провъзпалителни цитокини, които привличат моноцити-гранулоцити стимулиращ фактор 1 (M-CSF), и острофазови възпалителни цитокини като интерлевкин-1β.

В нашето изследване ясно се прояви протективният ефект на извлек от дървесина на *M. nigra* в модела на индуциран оксидативен стрес при макрофаги, в който и трите приложени концентрации доведоха до понижаване нивата на иРНК за NF-κB спрямо индуцираната от оксиданта експресия (фиг. 9). Вероятното обяснение за този ефект може да е проявата на антиоксидантни свойства на активни компоненти екстрахирани от дървесината в етанола. Доказателство за това е фактът, че в условията на LPS-индуцирано възпаление при макрофаги (фиг.19) извлекът инхибира стимулираната от LPS експресия на гена за NF-κB и най-вече спрямо контролните групи етанол, които в същите условия увеличават нивата на иРНК за провъзпалителния транскрипционен фактор, повече от колкото индуктора на възпаление приложен самостоятелно. В подкрепа на тези резултати са и данни от изследвания на други автори, които предполагат основната роля на полифенолите в растенията. При клинично изследване с хора е доказано инхибирането на същия транскрипционен фактор от богати на антоцианини растения (Karslen et al., 2007). Установено е, че кверцетинът намалява експресията на проинфламаторните цитокини TNFα, IL-1β, IL-6 и IL-8 в мастоцитна човешка клетъчна линия посредством инхибиране на ядрената транслокация на NF-κB, (Min et al., 2007.) Според Baker et al. (2011) основните таргетни молекули на полифенолите са ядрения-2 еритроид свързан фактор (Nrf2) и MAPK пътища, но е показано също, че фенолните съединения могат и директно да репресират

NF- $\kappa$ B сигнализацията.

Предвид факта, че NF- $\kappa$ B е един от основните транскрипционни фактори, участващи в регулацията на клетъчния отговор при стрес и възпаление, бе логично изследването на ефекта на етаноловия извлек на дървесина на черница, върху транскрипционните нива на таргетните за NF- $\kappa$ B провъзпалителни цитокини и ензими.

Според Xu et al. (2003) е важно комплексното изследване на генната експресия на секреторни продукти, продуцирани от взаимосвързани клетъчни линии. Установено е, че кондиционирана среда от макрофаги стимулира експресията на провъзпалителните цитокини IL-6, MCP-1 и TNF $\alpha$  в адипоцити (Permana et al., 2006, Kiselova-Kaneva et al., 2013).

В настоящият труд при оксидативно стимулираните преадипоцитни и макрофажни клетки, претретиран с извлек на дървесина на черница, бяха установени по-ниски нива на TNF $\alpha$  спрямо индуцираната от оксиданта експресия на цитокина (фиг.10 и 11). Тъй като основната цел на настоящото изследване е установяване на протективни ефекти на извлека от дървесината на черна черница, спрямо самостоятелното действие на екстрагента етанол, в случая е важно да се отбележи, че в условия на t-ButOОН индуциран оксидативен стрес в преадипоцити, изследвания извлек прояви инхибиращ ефект върху експресията на TNF $\alpha$ , докато контролната концентрация етанол имаше силно стимулиращо експресията действие, дори по-изразено от това на самия оксидант.

Тъй като етанолът сам по себе си е оксидативен агент, получените резултати относно мултиплицирането на ефекта при съвместно прилагане с t-ButOОН са логични. В модела на LPS-индуцирано възпаление в макрофагите претретиран с M 0,6 и M 1,25 се отчита понижаване на нивата на генна експресия на изследвания белтък, до стойности близки до ефекта на позитивната контрола SA, докато при контролните концентрации етанол не се наблюдава подобен ефект (фиг.20). Това дава основание да се предположи, че противовъзпалителното действие на извлека се дължи на екстрахираните активни компоненти.

Подобни ефекти на полифенолите върху проинфламаторни цитокини, включително върху TNF $\alpha$  са докладвани от много автори. LPS-стимулирано освобождаване на TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и втреклетъчни АКФ се потиска в резултат на антиоксидантната активност на активни компоненти изолирани от шафран, при третиране на мозъчни микроглиални клетки на плъхове (Nam et al. 2010). Демонстрирано е, че кафеена и хлорогенова киселина, екстрахирани от *G. mauritiana* и *D. apetalum* проявяват своето противовъзпалително действие в преадипоцити, чрез намаляване нивата на LPS-индуцираните провъзпалителни цитокини и хемокини като TNF $\alpha$ , IL-6 и MCP-1 (Marimoutou et al. 2015).

Въпреки установеното инхибиране експресията на NF-kB, прилагането на етанолов извлек на дървесина от черница в концентрация 1,25%, изненадващо стимулира експресията на другия изследван провъзпалителен цитокин IL-6 в преадипоцити. Можем да изкажем предположение, че този ефект се дължи на някои активни компоненти, екстрахирани от дървесината, които могат да активират различни MAPK сигнални пътища, независими от NF-kB транскрипционния фактор, тъй като при групите клетки третирани с контролните концентрации етанол няма промени в нивата на иРНК за IL-6. Според (Dong et al., 2002) активирането на MAPK сигналните пътища се смята за основен механизъм в индукцията на цитокините под въздействието на различни стимули.

В литературата се посочва главно инхибиращ ефект на различни растителни екстракти върху експресията на IL-6, като така се доказва противовъзпалително действие. Например Xiao et al. (2005), установяват инхибиращ ефект на екстракт от *Portulaca oleracea* върху експресията на IL-6 при адипоцитна клетъчна култура. Тасинов (2015) доказва инхибиране експресията на IL-6 под действие на воден екстракт от *S. ebulus* в условия на LPS-индуцирано възпаление при J774.A1 макрофаги.

Тъй като механизмът на NF-kB-опосредстваната регулация е доста комплексен и вероятно зависи от кооперативното действие на повече от един транскрипционен фактор (Jaramillo and Olivier, 2002), то е трудно

да се даде еднозначно обяснение на установеното от нас стимулиращото действие на екстракта върху експресията на IL-6. В научната литература са налице съобщения за подобно стимулиращо действие на растителни екстракти върху експресията на IL-6 главно върху макрофажни клетъчни култури във връзка с изследвания на имуностимулиращо действие, каквото е например действието на препарати съдържащи *Echinacea purpurea* (Rininger et al., 2000). Киселова-Кънева (2011) също установява увеличени транскрипционни нива на IL-6 в резултат на третиране на преадипоцити с водно-етанолов екстракт от *Agrimonia eupatoria*, което се обяснява с потенциален имуномодулиращ ефект на растението.

Много научни данни през последните години сочат, че цитокините, експресирани в адипозна тъкан са резултат от инфилтрацията на макрофаги между адипоцитите. Обикновено макрофагите в адипозна тъкан са до 10% от клетките, докато в случай на затлъстяване съдържанието им може да достигне до 60% от всички клетки в мастната тъкан (Weisberg et.al., 2003). Макрофажните цитокини като TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6 са известни стимулатори на адипокини в мастна тъкан (Pergana et.al., 2003) и осъществяват връзка между тези два клетъчни типа.

Противовъзпалителният ефект на извлека на дървесината на черница е демонстриран чрез понижаване нивата на иРНК за IL-1 $\beta$  в модела на индуцирано възпаление (фиг.21). Извлекът, приложен при LPS-индуцирано възпаление прояви изключително силно инхибиращо действие върху генната експресия на белтъка, дори по-силно от положителната контрола салицилова киселина. Интерес представлява фактът, че етанолът приложен в концентрация 1,25%, също понижи нивата на IL-1 $\beta$ , спрямо LPS-индуцираната експресия на цитокина, но в по-слаба степен спрямо ефекта на извлека на дървесина. Интересно е да се отбележи, че оксидантът стимулира генната експресия на цитокина в много по-ниска степен, в сравнение с LPS (фиг.13). Тъй като IL-1 $\beta$  е цитокин отговорен за острата фаза на възпаление, може да се допусне, че 24 часовото действието на оксидативен агент в макрофаги, не е достатъчно време за провокиране на

остарофазово възпаление в изследваните клетки. Най-вероятно системният оксидативен стрес може да провокира възпалителни процеси, маркер за което са повишените нива на IL-1 $\beta$ . Съществуват много научни изследвания във връзка с противовъзпалителния ефект на растителни полифеноли, чрез повлияване на транскрипцията на IL-1 $\beta$ . В тази насока е изследването на Wheeler et al. (2004), които твърдят, че интерлевкин-1 $\beta$  може да стимулира активирането на NF- $\kappa$ B по различен път на сигналната трансдукция, чрез активиране на I $\kappa$ B киназа (IKK). Авторите установяват, че полифенолни компоненти на зелен чай, като епигалокатехин-3-галат, проявяват мощни противовъзпалителни свойства, чрез инхибиране експресията на NF- $\kappa$ B, стимулирана от IL-1 $\beta$ .

Провъзпалителни цитокини като IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  са сред основните медиатори на възпалителния процес, допълнително стимулиращи генната експресия на провъзпалителните ензими COX-2 и iNOS (Haseeb et al. 2013).

Резултатите в модела на LPS-индуцирано възпаление при макрофаги представляват интерес, тъй като беше отчетено понижаване в нивата на провъзпалителните ензими COX-2 и iNOS под действие на 1,25% съдържание на етанол в хранителната среда, спрямо индуктора на възпаление (фиг.25 и 26). Този ефект на етанола обаче е изразен в много по-ниска степен спрямо ефектът на извлекa, който при концентрация 1,25% понижава иРНК за iNOS до стойности близки до действието на позитивната контрола салицилова киселина.

Много научни изследвания се фокусират върху противовъзпалителното действие на поплифенолите, като са описани различни механизми на действие. Така например полифенилите могат да инхибират провъзпалителни ензими като COX-2, LOX и iNOS, чрез активиране на PPAR $\gamma$ ; чрез инхибирането на фосфоинозитид 3-киназа (PI 3-киназа) и чрез активиране на ензими от фаза II за детоксикация на ксенобиотици (Yoon et al. 2005; Kim et al. 2004).

Съединенията, които са способни да намаляват продукцията на NO са



потенциални противовъзпалителни средства и по тази причина е изследвано действието на полифенолите катехин, нарингенин и физетин в RAW 264.7 макрофаги и човешки мононуклеарни периферни кръвни клетки, стимулирани с LPS (Lyu et al., 2005). Флавоноидите кверцетин и епикатехин могат да бъдат потенциален терапевтични средства срещу двата типа диабет, тъй като проявяват протективен ефект върху  $\beta$ -клетки по различни механизми, включително чрез понижаване на стрептозотоцин индуцирано производството на NO и противодействие на IL-1 $\beta$ -медирана цитотоксичност, вероятно чрез инхибиране на гена експресия на iNOS (Coskun et al., 2005).

Противовъзпалителният ефект на растението се проявява и по отношение нивата на иРНК за ICAM-1, тъй като при групата клетки, претретиран с извлека, беше отчетено понижаване в транскрипционните нива на адхезионния протеин до стойности близки до тези в клетките, претретиран с SA (фиг. 22).

В макрофагите, претретиран с контролните концентрации етанол не беше установена промяна в експресията на ICAM-1 спрямо клетките третиран само с LPS. Някои автори установяват връзка между антиканцерогенните свойства на активни компоненти в растенията и способността им да инхибират NF- $\kappa$ B-медираната експресия на COX-2 и молекули свързани с клетъчната адхезия като междуклетъчна адхезионна молекула-1, ендотелна левкоцитна адхезионна молекула-1 (ELAM-1) и адхезионна молекула на съдовите клетки (Rahman et al., 2006). Предполага се, че ICAM-1 индуцира възпалителни процеси чрез каскади, включващи няколко кинази, включително киназа, стимулираща миграция на левкоцити и с роля в редица злокачествени заболявания (Paulsen et al., 2015). Регулирането на тези адхезионни молекули вероятно е в отговор на локално освободени цитокини IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  и интерферон- $\gamma$  (Osborn, et al., 1989).

Според Makowsk and Notamisligil (2004) важна роля в интегрирането на метаболизма и възпалителните реакции в експериментални животински модели има aP2/FABP4 изоформа на ВМК-свързващия протеин, която

се синтезира в адипоцити и макрофаги.

Очаквано, в настоящото изследване третирането с LPS при макрофаги повиши експресията на aP2 (фиг. 23). Протективното действие на извлека се проявява в клетките с индуцирано възпаление, в които най-високата приложена концентрация демонстрира значителен потенциал за инхибиране на индуцираната от LPS експресия, със стойности дори по-ниски от действието на позитивната контрола салицилова киселина. Подобни резултати са докладвани и в други изследвания, като авторите предполагат, че вероятният механизъм на действие на растителни екстракти е посредством инхибирането на aP2, което от своя страна води до потискане нивата на провъзпалителни цитокини като TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 и MCP-1 (Kralisch and Fasshauer, 2012). Някои автори установяват, че в активирани макрофаги секрецията на aP2 се повишава, което води до диференцирането им в пенести клетки, които съхраняват холестеролови естери и освобождават цитокини като TNF $\alpha$ , IL-1 и моноцитен хемотаксичен протеин-1 (MCP-1) (Roden, 2007). Инхибирането на aP2 в модел на индуцирано затлъстяване при мишки, намалява както формирането на атеросклеротични лезии, така и образуването на пенести клетки (Makowski et al., 2001).

Изследвания от последните години показват, че активността на Sirt-1 се свързва с продължителността на жизнения цикъл при ограничен въглехидратен прием и е в основата на действие на храни, с доказани благоприятни ефекти върху здравето (Csiszar et al., 2008). Установено е, че ресвератролът, който е един от най-мощните агонисти на Sirt-1, ефективно намалява активността на TNF $\alpha$  и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцираната ендотелна активация (Csiszar et al., 2006) или LPS- и етанол- индуцираната експресия на TNF $\alpha$  в макрофаги (Csiszar et al., 2008), чрез инхибиране на транскрипционната активност на NF- $\kappa$ B.

Показателен е ефектът на извлека от дървесина на черница в условията на индуцирано възпаление, в който иРНК за Sirt-1 в клетките претретиранни с 1,25% извлек, се повишава спрямо LPS стимулираните макрофагите, до стойности сходни с действието на позитивната контрола SA (фиг.24).

Съществуват проучвания, според които третирането с етанол увеличава LPS стимулираната продукция на АКФ в RAW 264.7 миши макрофаги (Thakur et al., 2006). Според Wu et al. (2006). LPS и продуктите от метаболизма на етанол инхибират експресията на Sirt-1, чрез свръхпроизводство на АКФ и индукция на оксидативен стрес. Сходни резултати са получени при третирането на RAW 264.7 миши макрофаги с LPS, ацетоацетат и ацетат (Shep, et al., 2009). В същото изследване авторите установяват, че увеличаването на транскрипционните нива на проинфламаторния цитокин TNF $\alpha$ , в резултат на действието на индуктор на възпаление или метаболити от обезвреждането на етанол, могат да бъдат медиирани чрез потискане на генната експресия на деацетилазата Sirt-1. Предполага се, че Sirt-1 инхибира p65 субединицата на NF- $\kappa$ B чрез деацетилиране (Yeung et al., 2004).

Въз основа на получените резултати можем да предположим и друг евентуален механизъм на противовъзпалителния ефект на изследвания от нас извлек, а именно чрез повишаване транскрипционните нива на Sirt-1. В подкрепа на това заключение са резултатите от изследване, в което е установено, че инхибиторният ефект на ресвератрола върху NF- $\kappa$ B сигналния път, може да бъде медиран чрез активиране на Sirt-1 (Yang et al., 2000)

В настоящото изследване, потвърдихме ключовата роля на транскрипционния фактор NF- $\kappa$ B в индукцията на провъзпалителни цитокини като TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и ензими като COX-2 и iNOS и установихме противовъзпалителния ефект на извлека от дървесина на *M. nigra* чрез инхибиране на LPS и етанол стимулираната експресия на изследваните белтъци.

### **Влияние на етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* върху транскрипционните нива на гени свързани с липидния метаболизъм в диференцирани адипоцити**

Адипогенезата е процес на пролиферация и диференциация на клетките на мастна тъкан. В условия на положителен енергиен баланс тази тъкан е от решаващо значение за съхраняване на енергия и липидната хомеоста-

за, чрез акумулиране на триглицериди във функционалните мастни клетки, получени в процеса на адипогенеза от преадипоцити (Trayhurn and Wood, 2005). Установено е обаче, че дисбалансът между прием и разход на енергия води до затлъстяване, което е основен рисков фактор за много хронични и метаболитни заболявания като диабет тип 2, хипертония, хиперлипидемия и атеросклероза (Dave et al., 2012).

Молекулната основа на адипоцитната диференциация представлява координирана дейност на няколко транскрипционни фактора, включително PPAR $\gamma$  и C/EBP $\alpha$  (White and Stephens, 2009). Тези адипогенни фактори имат способността да регулират взаимно експресията на гени от крайния етап на диференциация. Висши мастни киселини свързващия протеин е един от специфичните адипогенни гени, таргетен за PPAR $\gamma$  и C/EBP $\alpha$ , и ключов медиатор на вътреклетъчен транспорт и метаболизма на мастни киселини (Naowaboot et al., 2012).

Резултатите от изследване ефекта на извлека от дървесина на черница върху липогенезата показваха значително понижение в нивата на иРНК за C/EBP $\alpha$  и aP2 спрямо контролите нетретирани клетки, в резултат на прилагането и на две концентрации на извлека, докато генната експресия на PPAR $\gamma$  се понижава статистически значимо само под действие на по-ниската концентрация (фиг. 27). Въпреки че това е първото проведено изследване за ефектите на извлек от дървесина на черница върху липидния метаболизъм, тези резултати не са изненадващи. Редица изследвания показват потенциала на растителни екстракти или отделни активни компоненти за потискане на адипогенеза в 3T3-L1 клетки. Suzuki et al. (2011) изследват инхибиторните ефекти на пет вида антоцианидини върху натрупване на триглицериди в 3T3-L1 клетки. Богатите на фенолни съединения плодове на боровинка, проявяват силна антиоксидантна активност и упражняват анти-адипогенна активност чрез инхибиране експресията на ключови регулатори на адипоцитната диференциация C/EBP $\alpha$  и PPAR $\gamma$  и техните таргетни адипоцит-специфични гени aP2 и FAS (Song et al., 2013).

В настоящото изследване беше установено инхибиторно действие на

извлекът от дървесина на черница, върху генната експресия на aP2 в двата вида изследвани клетъчни линии LPS стимулирани макрофаги (фиг. 23) и диференцирани 3T3-L1 адипоцити (фиг. 27), което еднозначно говори за анти-адипогения потенциал и противовъзпалителен ефект на активни компоненти в дървесината на черница и взаимовръзката между тези два физиологични процеса.

Редица проучвания съобщават, че екстаркти от черничев лист, плодове, корени значително намаляват холестерола в кръвта, триглицеридите в мастна тъкан и благоприятстват въглехидратната обмяна при диабет тип 2 (Kumar et al. 2008; Hue et al. 2011; Naowaboot et al. 2012; Varati et al. 2012). Тези данни ни позволяват да предположим, че вероятно и извлека от дървесината на растението може да бъде разглеждан като източник на потенциални средства при превенция и лечение на затлъстяване и диабет тип 2.

### **Връзка между оксидативен стрес, нискостепенно възпаление и затлъстяване**

В продължение на десетилетия заболявания като метаболитен синдром и диабет тип 2 са пандемия, както за икономически развитите, така и за развиващите се страни. Молекулните механизми водещи до проява на тези метаболитни нарушения са сложни и комплексни, като повече научни данни сочат, че оксидативният стрес и нискостепенното възпаление играят важна роля в развитието им (Evans et al., 2005). Повишената продукция на АКФ предимно от митохондриите може да доведе до увреждане и апоптоза на  $\beta$ -клетките на панкреаса и съответно до понижаване секрецията на инсулин (Rosen et al., 2001). Възможно е компонентите на оксидативния стрес директно да активират вътреклетъчни сигнални пътища, например на протеин киназа С и NF- $\kappa$ B, като по този механизъм се нарушава сигналният път на инсулина, което води до инсулинова резистентност (Scivittaro et al., 2000). Скорешни лабораторни и клинични изследвания доказват, че диабетът в действителност е възпалително заболяване,

което корелира с индукцията на проинфламаторни цитокини като TNF $\alpha$  и IL-6, получени в резултат на активиране на кинази или по сигналния път на NF- $\kappa$ B (Donath and Shoelson, 2011; Xie and Du, 2011). Тези провъзпалителни цитокини се продуцират както от адипоцити, така и от макрофаги.

За първи път връзката между затлъстяване, възпаление и инсулинова резистентност е дискутирана от Hotamisligil et al. (1993). В проучването си авторите констатират повишени нива на иРНК за TNF $\alpha$  в мастна тъкан в животински модел на затлъстяване, а инхибирането на TNF $\alpha$  в затлъстели мишки улеснява действието на инсулина върху транспорта на глюкоза. Един от възможните молекулярни механизми в основата на индуцираната от TNF $\alpha$  инсулинова резистентност според Maury and Brichard (2010) може да включва инхибиране на инсулин рецепторния субстрат (IRS)-1 което води до потискане ефектите на инсулина. Същите автори твърдят, че зрели адипоцити секретират TNF $\alpha$ , но основно производството му се извършва в макрофаги, което е в потвърждение на факта, че макрофажните възпалителни цитокини повлияват процесите на затлъстяването и метаболитен синдром.

Освен това освободените при възпаление цитокини активират синтеза на важни провъзпалителни ензими като iNOS и COX-2 (Xie and Du, 2011).

От казаното до тук може да се направи заключение, че повишената продукция на АКФ се свързва с активирането на сигнални транскрипционни фактори, регулиращи генната експресията на провъзпалителни цитокини и ензими, водещи до хронични или/и остро възпаление процеси провокиращи затлъстяване, развитието на инсулинова резистентност, метаболитен синдром, диабет тип 2, атеросклероза, артериална хипертония и други сърдечно-съдови заболявания.

Имайки предвид тези факти и изводи, логично е да се очаква, че биологично активни растителни компоненти, които проявяват висока АОА биха могли да модулират процесите на възпаление и по този начин да намалят вероятността от развитие на съответните усложнения. Анализирането на антиоксидантното, противовъзпалително и антиобезитно действие на ета-

нолов извлек от дървесина на черна черница в *in vitro* модели на индуциран оксидативен стрес и възпаление, показва, че дървесината на *Morus nigra* може да се окаже потенциален източник на активни компоненти в превенцията и лечението на различни хронични заболявания.

## VI. ИЗВОДИ

1. Общото полифенолно съдържание значително корелира с антиоксидантна активност на 40 % водно-етанолови извлекци от дървесини на четирите изследвани растения ( $r > 0,90$ ).
2. Най-високо съдържание на общи полифеноли и най-силно изявена антиоксидантна активност се установи в 40% водно-етанолов извлек на дървесина на *Morus nigra*.
3. Нарастването на фенолното съдържание и антоксидантния потенциал на водно-етаноловите извлекци на дървесини са най-високи до 40 ден от екстракцията, след което промените в тези показатели са незначителни.
4. Качественият фитохимичен състав на дървесина от черница е следният: флаваноици, терпеноиди, танини, сапонини, хинони, сърдечни гликозиди, въглехидрати.
5. Водно-етанолов извлек на дървесина от черница не проявява цитотоксично действие върху преадипоцити и макрофаги в диапазона от 0,15% до 2,5% съдържание в хранителна среда.
6. Етанолът в нарастващо процентно съдържание в хранителна среда води до намаляване на клетъчната жизнелост и при двата типа клетъчни линии.
7. Водно-етанолов извлек на дървесина от черница приложен върху 3T3-L1 преадипоцити:
  - 7.1. Индуцира генната експресия на ензимите от метаболизма на глутатион GCL и по-слабо GPx-4, като ефектът корелира положително с процентното съдържание на извлека в хранителната среда;
  - 7.2. Противовъзпалителният потенциал на дървесина от черница се проявява чрез потискане експресията на гените за TNF $\alpha$ , IL-6, COX-2 и iNOS, индуцирана от етанола;
  - 7.3. Имуномодулиращите свойства на извлека се изразяват в повишаване нивата на iPINK за IL-6.



8. В модел на индуциран оксидативен стрес в преадипоцити водно-етанолов извлек от дървесина на черница:
  - 8.1. Проявява антиоксидантни свойства, като потиска експресията на GCL и GPx-4 в условия на оксидативен стрес;
  - 8.2. Проявява противовъзпалително действие като потиска експресията на гените за NF-kB, TNF $\alpha$ , COX-2 и iNOS в условия на оксидативен стрес.
9. Водно-етанолов извлек на дървесина от черница приложен върху J774A.1 макрофаги:
  - 9.1. Индуцира генната експресия на ензимите от метаболизма на глутатион GCL и GPx-4, като ефектът корелира положително с процентното съдържание на извлека в хранителната среда;
  - 9.2. Проявява противовъзпалителен потенциал чрез потискане експресията на гените за NF-kB, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , COX-2, iNOS, aP2, индуцирана от етанола;
  - 9.3. Проявява имуностимулиращо действие чрез индуциране експресията на гена за Sirt-1.
10. В модел на индуциран оксидативен стрес и възпаление в макрофаги водно-етанолов извлек на дървесина от черница:
  - 10.1. Проявява антиоксидантни свойства, като потиска експресията на GCL и GPx-4 в условия на индуциран оксидативен стрес и възпаление;
  - 10.2. Проявява противовъзпалително действие като потиска експресията на гените за NF-kB, TNF $\alpha$ , IL- $\beta$ , ICAM-1, COX-2 и iNOS в условия на индуциран оксидативен стрес и възпаление;
  - 10.3. Проявява противовъзпалително действие като стимулира експресията на гена за Sirt-1.
11. Водно-етанолов извлек на дървесина от черница проявява антиобезитен потенциал чрез потискане експресията на гени свързани с липидния метаболизъм в диференцирани адипоцити.

## VII. ПРИНОСИ

- За първи път е определено общо полифенолно съдържание и антиоксидантна активност (*in vitro*) на водно-етанолов извлек от дървесина на черница (*M. nigra*), като е установена висока корелационна зависимост между двата показателя.
- За първи път е установен диапазонът на концентрациите на извлека, които са нетоксични при прилагане върху преадипоцити и макрофаги.
- Получени са първите научни данни за антиоксидантните и противовъзпалителните свойства на извлека, чрез повлияване експресията на редокс-сензитивни гени и гени за провъзпалителни белтъци в норма и в модели на оксидативен стрес и възпаление.
- Получени са първите научни данни за антиобезитен потенциал на извлека, чрез повлияване експресията на гени свързани с липидния метаболизъм в диференцирани адипоцити.

## VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### Публикации свързани с дисертационния труд

1. **Pasheva, M.**, Nashar, M., Pavlov, D., Slavova, S., Ivanov, D., Ivanova, D. (2013). Antioxidant capacity of different woods traditionally used for coloring hard alcoholic beverages in Bulgaria. *Science&Technologies*, Vol. III, Number 1, Medicine, pp. 123-127.
2. **Pasheva, M.**, Pavlov, D., Tasinov, O., Nashar, M., Kiselova-Kaneva, Y., Ivanova, D. (2013). Cytoprotective and cytoproliferative effects of ethanol infusions from *Morus nigra* and *Cotinus Coggygria* heartwood in 3T3-L1 preadipocytes. In: *Scr Sci Med*, vol.45, suppl.6, 2013, pp. 25-28.
3. **Pasheva, M.**, Nashar, M., Tasinov, O., Ivanova, D. (2015) Effects of mulberry heartwood extract on genes related to lipid metabolism. *Scr Sci Pharm*, vol. 1, 2015, pp 20-25.
4. **Pasheva, M.**, Nashar, M., Ivanova, D.P., Tasinov O., Ivanova D.I. (2015) Effects of mulberry heartwood extract on the gene expression of NF-kB and two proinflammatory cytokines in a cell culture model of oxidative stress. *Science & Technologies*, Volume V, Number 1, Medicine, pp.47-54.

### Участия свързани с дисертационния труд

1. **Пашева, М.**, Нашар, М., Павлов, Д., Славова, С., Иванов, Д., Иванова, Д. (2013). Антиоксидантен капацитет на различни видове дървесини, традиционно използвани за оцветяването на високо-алкохолни напитки в България. Десета национална конференция по медицинска биология, 25-27 октомври, 2013 г., Плевен.
2. **Pasheva, M.**, Nashar, M., Pavlov, D., Slavova, S., Ivanov, D., Ivanova, D. (2013). Antioxidant capacity of different woods traditionally used for coloring hard alcoholic beverages in Bulgaria. 23rd International Scientific Conference, 6-7 June 2013, Stara Zagora.

3. **Pasheva, M.**, Nashar, M., Tasinov, O., Ivanova D. (2014) Effects of mulberry heartwood extract on genes related to lipid metabolism. Scientific and Practical Conference “Challenges in the Education of Masters of Pharmacy”, November 1, 2014, Varna, Bulgaria, Book of abstracts Scripta Scientifica Pharmaceutica, vol. 1, 2014, suppl. 1, p. 24.
4. **Pasheva, M.**, Nashar, M., Ivanova, D.P., Tasinov O.,Ivanova D.I. (2015) Effects of mulberry heartwood extract on the gene expression of NF-kB and two proinflammatory cytokines in a cell culture model of oxidative stress. 25th International Scientific Conference, 3-5 June 2015, Stara Zagora.

## **IX. ФИНАНСИРАНЕ**

Проект № 14013/2015: „Проучване терапевтичния потенциал на дървесина от черна черница като ресурс за фармацевтичната индустрия”, финансиран от Фонд „Наука“ при МУ – Варна.

Ръководител на проекта: проф. Диана Иванова, дбн