

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

Миглена Николаева Тодорова

**ПОЛУЧАВАНЕ НА БОГАТ НА АНТОЦИАНИНИ
ЕКСТРАКТ ОТ ПЛОДОВЕ НА БЪЗАК (*SAMBUCUS
EBULUS*) И ОХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА БИОЛОГИЧНАТА
МУ АКТИВНОСТ С ОГЛЕД ИЗПОЛЗВАНЕТО МУ КАТО
СУРОВИНА ПРИ ПРОИЗВОДСТВОТО НА ХРАНИ И
ЛЕЧЕБНИ СРЕДСТВА**

АВТОРЕФЕРАТ

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

Научен ръководител:

Доц. Йоана Киселова-Кънева, дб

Научен консултант:

Проф. Бистра Галунска, дф

Официални рецензенти:

Проф. Регина Комса-Пенкова, дбн

Доц. д-р Анелия Веселинова Биволарска, дб

ВАРНА

2019

СЪДЪРЖАНИЕ:

I. ВЪВЕДЕНИЕ.....	5
III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	6
IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	7
1. Растителен материал.....	7
2. Методи за екстракция и фракциониране.....	7
3. Методи за определяне на фитохимичен състав.....	8
4. Методи за определяне на антиоксидантна активност на екстрактите.....	10
5. Методи за определяне на биологичната активност на екстракти....	11
6. Статистическа обработка и графично представяне на резултатите..	13
V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	14
1. Оптимизиране на екстракционната процедура.....	14
2. Разработване, оптимизиране и валидиране на методи за фитохимичен анализ на фенолни съединения в растителни екстракти.....	19
3. Антиоксидантната активност на получените екстракти.....	34
4. Определяне влиянието на екстракти от <i>Sambucus ebulus</i> върху жизнеността на J744A.1 макрофаги.....	43
5. Изследване влиянието на екстракти от плодове на <i>Sambucus ebulus</i> върху J774A.1 макрофажна клетъчна линия в модел на LPS индуцирана цитотоксичност.....	46
6. Изследване влиянието на тотален екстракт и антоцианинова фракция от плодове на <i>Sambucus ebulus</i> J774A.1 макрофаги върху експресията на гени, свързани с антиоксидантната защита в условия на третиране с LPS.....	56
7. Влияние на тоталния екстракт и получената пречистена антоцианинова фракция от плодове на <i>Sambucus ebulus</i> върху експресията на провъзпалителни фактори при J774A.1 макрофаги, в условия на LPS индуциран възпалителен отговор.....	85

8. Влияние на тоталния екстракт и получената пречистена антоцианинова фракция от плодове на Sambucus ebulus върху експресията на гени свързани с фагоцитоза.....	136
VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	149
VII. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ.....	151
VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	155
IX. ФИНАНСИРАНЕ.....	157

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

Дисертационния труд обхваща 240 страници, 53 фигури и 63 таблици. Цитирани са 366 заглавия.

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

Експерименталната работа по дисертационния труд е извършена в Катедрата по биохимия, молекулна медицина и нутригеномика при Медицински университет – Варна.

*Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе наот.....часа в.....
на открито заседание на Научното жури*

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Предвид огромното видово разнообразие на растенията, а също така и големия брой идентифицирани съединения с растителен произход, става ясно, че лечебният им потенциал е огромен и все още недостатъчно изследван. Проучването на връзките между съществуващите емпирични данни от народната медицина и механизма на лечебното действие на растенията се подпомага от нарастващите и бързо развиващите се възможности на съвременните медикобиологични изследвания и клинични проучвания. Необходимостта от точна научно обоснована информация за действието на лечебните растения става все по-остра и във връзка с рисковете от некомпетентното им използване (Николов, отг. ред., 2007).

Традициите на народната медицина в много страни по света са съхранили хилядолетното познание за благотворното действие на билките върху здравето. Съвременните проучвания на лечебното действие на растения, традиционно използвани в страни като Китай, Индия, страните от Южна Америка, Средиземноморието и други, са многобройни и обикновено именно богатият опит на народната медицина е служил като отправен момент за откриване на нови лечебни средства. В голямата си част тези изследвания се отнасят до антиоксидантните свойства на съединенията, съдържащи се в различен вид екстракти приготвяни от растителен материал, на които се отдават и множество други биологични ефекти.

Изучаването на молекулните ефекти на лечебните растения и на техни биологично-активни компонент и идентифицирането на нови молекулни таргети на действие е от съществено значение за развитието на науката за храненето, биотехнологията и фармацията. Разработването на нови храни и лечебни средства е от значение за решаване на обществени предизвикателства, касаещи безопасността на храните и здравето.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел:

Да бъде получена и пречистена антоцианинова фракция от плодовете на Бъзак (*Sambucus ebulus*) и да се изследва *in vitro* биологичната активност на получената фракция.

Задачи:

I. Получаване, фракциониране и охарактеризиране на екстракт от плодове на Бъзак (*Sambucus ebulus*).

1. Оптимизиране на екстракционна процедура и пречистване на антоцианинова фракция от плодове на Бъзак (*Sambucus ebulus*).
2. Разработване и валидиране на методи за определяне на фитохимичния състав и антиоксидантната активност на общия екстракт и антоцианиновата фракция.

II. Изследване на *in vitro* биологичната активност на получения общ екстракт и антоцианиновата фракция от плодове на Бъзак (*Sambucus ebulus*) в модел на третиране на клетъчна култура с бактериални LPS.

1. Да се изследва цитотоксичния и пролиферативен ефект на получения екстракт и антоцианиновата фракция върху нестимулирана макрофажна клетъчна линия.
2. Да се изследва цитопротективният ефект на получения екстракт и антоцианиновата фракция върху макрофажна клетъчна линия в модел на липополизахарид (LPS) индуцирана цитотоксичност.
3. Да се изследва влиянието на получения екстракт и антоцианиновата фракция върху експресията на гени, свързани с антиоксидантната защита.
4. Да се изследва влиянието на получения екстракт и антоцианиновата фракция върху експресията на гени, свързани с възпалителния отговор.
5. Да се изследва влиянието на получения екстракт и антоцианиновата фракция върху експресията на гени, свързани с фагоцитоза.

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Растителен материал

В настоящото изследване са включени две групи плодове на бязак – изсушени плодове и замразени след брането плодове при температура -20°C (табл 5). Използваният растителен материал е от няколко източника, закупен: от търговската мрежа Талодерма трейд ООД, Варна, България и събран от различни местности в района на гр.Варна. Брането е извършено в периода на узряване на плодовете на бязак август-септември. Плодовете са транспортирани в подходящи съдове, след което внимателно отделени от дръжките, без да се нарушава целостта им, след което са сушени в сушилни, на сянка при температура 20°C , а пресните плодове са замразени при -20°C . Съхранението на сухите плодове беше извършвано на сухо и проветриво място, а на замръзените във фризер при температура -20°C .

2. Методи за екстракция и фракциониране

Екстракционен подход за получаване на тотален екстракт от плодове на *S.ebulus*

За извличане на фенолните компоненти от растителния материал е използвана течно-течна екстракция и екстракция в твърда фаза. На база на литературните данни е разработена и оптимизирана екстракционна процедура за по-пълно извличане на антоцианините, съдържащи се в плодовете от бязак (J. Whitaker, Current Protocols in Food Analytical Chemistry, 2001).

Получаване на пречистена антоцианинова фракция

За отстраняване на захари и органични киселини от тоталния екстракт и получаване на пречистена антоцианинова фракция беше използвана екстракция в твърда фаза. Подбрани са неполярни (C18) колонки за твърдофазна екстракция, Hypersel C18/500 mg (Thermo Scientific, USA) които да задържат хидрофобните органични съединения.

3. Методи за определяне на фитохимичен състав

За химически анализ на получените екстракти са използвани спектрофотометрични и хроматографски методи, които бяха валидирани за нуждите на експеримента.

Определяне на концентрацията на общи полифеноли

Концентрацията на полифеноли беше определяна в различните видове фракции посредством спектрофотометричния метод на Singleton & Rossi (1965), с модификации на протокола (J. Whitaker, Current Protocols in Food Analytical Chemistry, 2001).

Определяне на концентрацията на общи флавоноиди

Концентрацията на флавоноидите беше определяна по метод, основаващ се на способността на алуминиевия йон да образува червени хелати с флавоноида в акална среда (Zhishen et al., 1999), модифициран за нуждите на експеримента.

Определяне на концентрацията на общи мономерни антоцианинови пигменти

Концентрацията на мономерни антоцианинови пигменти в получените екстракти беше определяна по рН-диференциалния метод, основаващ се на способността на антоцианините да проявяват цветови вариации при различни стойности на рН. В кисела среда (рН 1.0) антоцианините съществуват главно като червен флавилиев катион. Когато се повиши рН (рН 4.5), те търпят тавтомеризация и преобладава безцветната форма карбинол. рН-диференциалният метод се основава на тази промяна (J. Whitaker, Current Protocols in Food Analytical Chemistry, 2001).

Хроматографско определяне на фитохимичният състав

Хроматографското определяне на фитохимичния състав беше извършено по метода на течната хроматография с мас-селективна детекция. Идентификацията беше извършена по времената на задържане и отношението маса/заряд, а количествения анализ чрез външна калибровка по метода на стандартната добавка. Предварително идентифициране се основаваше на данните от литературата.

Извършени са два различни вида калибриране: калибриране със стандартни разтвори на изследваните полифеноли и в матрица. Приготвени са първични стандартни разтвори с концентрация 1 g / L от всеки анализ в метанол, които се аликватират и се съхраняват при -21°C. Работна стандартна смес (10 mg/L) на тестваните полифеноли се получава от първичните стандарти чрез разреждане със 70% метанол. Калибрирането се извършва в три концентрационни диапазона: 0.05 mg/L - 0.5 mg/L, 0.5 mg/L - 5.0 mg/L и 5.0 mg/L - 50 mg/L. За калибриране за всеки диапазон бяха приготвени седем стандарта чрез разреждане на работната стандартна смес с 70% метанол.

Калибровката в матрица е извършена за всеки от тестваните полифеноли в седем калибрационни нива (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.7, 1.0 и 1.4 mg / L). Към екстракт от плодове на *Sambucus ebulus* са добавяни нарастващи концентрации от работните стандарти на изследваните полифеноли. Всеки стандарт е инжектиран трикратно в хроматографската система. Построени са калибровъчни графики за всеки анализ чрез нанасяне на площта на пика на ординатата и съответната концентрация на абсцисата. Корелационните коефициенти (R²) са използвани за оценка на линейността на зависимостта площ на пика/концентрация. Така получените калибровъчни графики са използвани за определяне на концентрациите на полифенолите в пробите.

LC-PDA-MS система

Анализите са извършени на хроматографска система ACQUITY H class Ultra Performance LC (UPLC) (Waters, Milford, MA, USA), оборудвана с вакуум дегазер, кватернерна градиентна помпа,

автосемплер, UV-детектор с диодна матрица (PDA) и мас-селективен детектор с единичен квадрупол (QDa). Температурата на пробата и на хроматографската колона са поддържани при $4\pm 1^\circ\text{C}$ и $50\pm 1^\circ\text{C}$, съответно. Анализите са извършвани с двата детектора, работещи в паралел. С PDA детектора е отчитана абсорбцията на анализите при 3 дължини на вълната 272 nm, 205 nm и 305 nm и разделителна способност 2.4 nm. Масспектралната детекция е осъществена в негативен режим на електроспрей йонизация (ESI), напрежение на конуса 15,0 kV, напрежение на капилярата 0,8 kV, температура на сондата 600°C , честота на дискретизация 8 точки/сек. Количественият анализ е извършван в режим на следене на определен йон (single ion monitoring, SIM).

Хроматографското разделяне на полифенолите е извършено на обратнофазова хроматографска колона Cortecs UPLC C18, (90A, 1.6 μm , 2.1 mm x 50 mm) (Waters, USA). Подвижната фаза (ПФ) е пропускана със скорост на потока 0.3 ml/min. Съставът на ПФ е метанол съдържащ 0.2% (v/v) мравчена киселина (А) и вода с 0.1% (v / v) мравчена киселина (В). Разделянето е извършено в градиентен режим: начален състав на ПФ: 10% А, 90% В; 0-8 мин; 90% А, 10% В (крива 6); 8-13 min: 10% А, 90% В (крива 11); 13-15 мин.: 10% А, 90% В (крива 11). Времето на анализа е 15 минути.

Данните са анализирани с помощта на специализиран хроматографски софтуер Empower® 3.0 Chromatography Data Software (Waters, USA). Идентификацията е извършена по времето на задържане и по съотношението маса на на молекуления йон/заряд.

4. Методи за определяне на антиоксидантна активност на екстрактите

ABTS - катион радикал деколоризационен метод

Антиоксидантната активност (АОА) на водните и водно-алкохолните екстракти е определена чрез ABTS [2,2'-азинобис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонова киселина)] катион радикал деколоризационен метод (Re et al., 1999) с модификации. Методът се основава на консума-

цията на преформирания в присъствието на калиев персулфат ABTS радикал ($ABTS^{+}$), чийто абсорбционен максимум е при 734 nm. В присъствие на антиоксиданти $ABTS^{+}$ се редуцира до ABTS. По намалението на абсорбцията на реакционната смес в присъствието на гасители на $ABTS^{+}$ се съди за антиоксидантната активност на изследваното съединение или екстракт.

DPPH

Друг начин за оценка на антиоксидантната активност на получените фракции е с DPPH (1,1-дифенил-2-пикрилхидразил) по метода на Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995) с модификации. Методът се основава на способността на полифенолите да погасяват DPPH радикала, изразяващо се в промяна на цвета от пурпурен в бледо жълт. Резултата се изразява като процент инхибиране на DPPH радикала.

5. Методи за определяне на биологичната активност на екстрактите

Клетъчна линия и субкултивиране на клетъчната линия

Клетъчната линия, използвана в *in vitro* експериментите е закупена от ATCC (American Type Culture Collection) – САЩ.

J774A.1 е моноцитно-макрофажна миша (*Mus musculus*) клетъчна линия, съхранявана се в течен азот. Клетките са с макрофажна морфология и са диференцирани. Произвеждат и освобождават в културалната среда IL-1 и други фактори. Експресират на повърхността си С3 фактор на комплемента. Имат способност да осъществяват антитяло-опосредствана фагоцитоза. Растежът им се инхибира от декстран сулфат и бактериални липополизахариди (LPS).

За култивиране на клетките е използвана DMEM хранителна среда (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), съдържаща 4,5 g/L глюкоза, L-глутамин и фенол ред с добавени към нея пеницилин и стрептомицин (100 U/ml крайна концентрация) и фетален телешки серум с крайна концентрация 10%. За приготвяне на разтворите за третиране в различните експерименти е използвана DMEM хранителна среда, съдържаща 4,5 g/L глюкоза, без фенол ред и без добавени пеницилин, стрептомицин и фетален телешки серум.

Процедура за субкултивирането на клетъчните култури: клетките се култивират в 75cm² фласки като не се допуска да превишат 70-80% конfluентност. След отстраняване на старата хранителна среда клетките се отлепят със стъргалка. След преброяване, се засяват с необходимата гъстота за експеримент или за последващо субкултивиране. Клетъчните култури се инкубират на тъмно при 37°C, 5% CO₂.

МТТ тест за цитотоксичност

Тестът за цитотоксичност се извършва по метода на Mosmann (1983) с някои модификации (Kiselova-Kaneva et al., 2012). Наименованието на теста идва от абревиатурата, използвана за означаване на съединението 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ). Методът за определяне на цитотоксичността на различни агенти се основава на способността на ензимните системи на жизнеспособните клетки да редуцират това съединение, което е с жълт цвят, до пурпурно виолетов формазан. Жизнеността на третираните клетки се определя като процент от нетретираната контрола, чиято жизненост се приема за 100%.

Описание на експерименталните модели на клетъчната култури използвана при *in vitro* изследванията.

Клетките (J774A.1 макрофаги) се посяват в 6-ямкови фласки с гъстота 2x10⁵ кл/ямка с общ обем на инокулума 2 ml в хранителна среда за субкултивиране. При третиране се използва хранителна среда съдържаща желаните концентрации от съответния индуктор (LPS) от стандартен шам на *Escherichia coli* серотип 026:B6, екстракт и хранителни вещества и др. Всяко едно третиране на клетъчната култура е предшествано от отстраняване на предходната хранителна среда.

Определяне нивата на генна експресия

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

Изолиране на РНК от клетки

Изолирането на РНК от клетъчни култури е извършено с помощта на TriReagent[®], като лабораторният протокол по изолирането следваше указанията на производителя.

Обратна транскрипция – RT-PCR

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

Real Time qPCR

Втората стъпка при количествен Real-Time PCR анализ е амплификация на кДНК в реално време с помощта на ген-специфични праймери. Праймерите се съставят с помощта на Real-Time PCR gene expression Design Tool със свободен достъп в Интернет, и са синтезирани от Sigma-Aldrich и Integrated DNA Technologies.

Като матрица за провеждане на количествен Real-time PCR се използва 0,39 μ l кДНК. Крайната концентрация на праймерите в реакционната смес е 300nM.

Реакциите се извършват в 96 ямкови плаки, при следните параметри: активиране на ензима и денатурация - 95°C/5 min; амплификация - 95°C/15sec, анилинг - 60°C/1 min, 40 цикъла. Анализът се извършва с ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). Стойностите на генната експресия се изчисляват по $2^{-\Delta\Delta Ct}$ метода (Livak and Schmittgen, 2001) и се представят в относителни единици, в сравнение с нетретирания контрола, при която нивото на експресия на анализирания ген се приема за единица. Резултатите се представят като средна стойност на относителните единици \pm стандартна грешка. Като ендогенна контрола, спрямо която се нормализират стойностите на флуоресценция, се използва β -актин. Всички измервания се извършват в три повторения. PCR ампликоните при Eva Green-базираният анализ се проверяват за наличие на неспецифична амплификация чрез построяване на денатурационна крива.

6. Статистическа обработка и графично представяне на резултатите

Получените стойности са представени като средна стойност от минимум три измервания \pm стандартна грешка на средната стойност (Mean \pm SEM) или \pm стандартното отклонение (Mean \pm SD). Данните са

статистически обработени с one way ANOVA, при ниво на достоверност $p < 0.05$ и са сравнени със Student's *t*-тест. Обработката на данните беше извършена с помощта на статистическия софтуерен продукт GraphPad Prism (Ver. 5.0 GraphPad Software, Inc.).

V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Оптимизиране на екстракционната процедура

При избора на подходяща екстракционна процедура се взеха под внимание и бяха оптимизирани следните параметри: мацерация на плодовете от *S. ebulus*; продължителност и етапи на течно-течната екстракция; параметрите за вакуум-концентрация на екстрактите; някои етапи от твърдофазната екстракция.

Приготвяне на общ екстракт от растителен материал

Средна проба от изсушени плодовете на бъзак се претегля на аналитична везна (0,5 g), след което сухите плодове се мацерират в продължение на 1 час на тъмно, като към тях по време на мацерацията се прибавя дестилирана вода. Количеството на водата беше определено от влагосъдържанието в свежите плодове по литературни данни (цитат). Към мацерираната проба се прибавя екстрагента, 70% воден разтвор на ацетон, подкислен с 0,01% HCl в съотношение плод – екстрагент 1:10. (J. Whitaker, Current Protocols in Food Analytical Chemistry, 2001).

При работа със замръзени плодове на бъзак, след размразяването им, на аналитична везна се претеглят 0,5g плод, след което се екстрахират със 70% воден разтвор на ацетон, подкислен с 0,01% HCl в съотношение плод – екстрагент 1:10.

Подкисляването е необходимо, за да се запазят стабилността на антоцианините и да в следващата стъпка. Пробите се екстрахират неколкостранно по 5 минути на Vortex-миксер със 70% ацетон до обезцветяване на екстракта. Супернатантите от отделните екстракции се обединяват. Към полученият тотален екстракт за отделяне на хидрофилните компоненти се прибавя равен обем хлороформ, разклаща се и се оставя 24 часа при температура 4°C за разслояване на фазите. Добавянето на хлороформ води до разпределяне на компонентите в зависимост от тяхната полярност в хидрофилната фаза (съдържаща антоцианини, феноли, захари, органични киселини и други водоразтворими съединения) и

липофилна фаза (съдържаща липиди, каротеноиди, хлорофилни пигменти и други неполярни съединения). Предимството на така описания подход е получаване на екстракт без липофилни замърсители. Оцветената водна фаза, след разделянето се подлага на изпаряване до сухо във вакуум концентратор (Genevac) при температура не по-висока от 40°C, за отстраняване на органичните разтворители, след което се довежда до първоначален обем с дестилирана вода. Така полученият пречистен екстракт се подлага на твърдофазна екстракция (SPE).

Пречистване на хидрофилния екстракт с твърдофазна екстракция

Пречистването на хидрофилната фракция чрез екстракция в твърда фаза позволява отстраняване на интерфериращите съединения, присъстващи в непречистените екстракти. Подбрани са неполярни (C18) колонки за твърдофазна екстракция, които да задържат хидрофобните органични съединения и същевременно да позволят елуирането на захарите и захарните киселини .

Колонките предварително се активират с метанол, след което се кондиционират с подкиселена с 0,01 % HCl дейониизирана вода. Пробата се апликира, след което с подкиселена с 0,01% HCl дейониизирана вода се елуират захарите и захарните киселини. Следва елуиране на процианидините с етилацетат, което допълнително пречиства задържаните върху сорбента пигменти. Елуирането на антоцианините се извършва с метанол, подкислен с 0,01% HCl. Получените фракции се изпаряват под вакуум при температура не по-висока от 40°C до сух остатък, след което се довеждат до първоначален обем с дейониизирана вода

Концентриране и изпаряване на получените екстракти

Концентрирането на получените екстракти е извършено във вакуум концентратор, работещ при ниски температури под 40° C. Концентрирането е извършено под вакуум 100 mbar за около 40 минути. Получените концентрати са разтваряни с дейониизирана вода до първоначален обем и са подложени на химичен анализ. За хроматографското определяне на флавоноиди в получените екстракти сухият остатък се разтваря в 70% метанол до началния обем. Бяха взети аликвотни части

и филтрат през 0.22 μm тефлонов филтър преди хроматографския анализ.

Обсъждане

Предвид факта, че лечебните растения са неразделна част както от традиционната, така и от нетрадиционната медицина, усилията в търсене на подходящи методи и техники за извличане на активните компоненти, които се съдържат в тях е основна задача пред изследователите. Целта на това изследване е да използва предишните традиционни и съвременните научни данни относно ефикасността и клиничните приложения на *Sambucus ebulus* и да разкрие нов терапевтичен потенциал на билката и даде възможност за нови изследвания с цел използването и при разработване на различни фитопрепарати.

До момента липсват данни за сравнително разглеждане на биологичната активност на тотален екстракт и получена от него богата на антоцианини фракция от замразени плодове на бъзак.

Стабилността на антоцианините е от решаващо значение за биологичната им активност. Под формата на флавинов катион те са най-стабилни при ниско рН. Различни киселини като солна, ябълчена, винена, аскорбинова, лимонена и оцетна са използвани за регулиране на рН на ANC (Heinonen et al., 2016). Присъствието на аскорбинова киселина в реакционната смес може да повлияе отрицателно върху стабилността на антоцианините (HernandezHerrero & Frutos, 2015; West & Mauer, 2011).

Изборът на подходящ метод за екстракция на полифеноли и в частност на антоцианини е от определящо значение за последващия анализ на тези съединени и до голяма степен определя добива, пряко зависи от естеството на антоцианините и от изходния материал. Добрата екстракционна процедура цели минимално количество екстрагент и минимална деградация или промяна на нативното (*in vivo*) състояние на биологично активните вещества. Познването на факторите, които влияят върху структурата и стабилността на антоцианините е от особена важ-

ност. В повечето плодове и зеленчуци антоциановите пигменти се намират в клетки в близост до повърхността на плода. Процедурите за извличане обикновено включват използването на кисели разтворители, които денатурират клетъчните мембрани и едновременно с това разтварят пигментите. Киселината има способността да стабилизира антоцианините, но може да промени и естествената форма на пигмент в тъканта чрез разкъсване на асоциати с метали, ко-пигменти или други фактори. Процедурите за концентриране могат също да причинят киселинна хидролиза на лабилни ацилни и захарни остатъци, което прави вакуумконцентрацията правилен избор за отстраняване на разтворителите. За да се добият антоцианини по-близко до тяхното естествено състояние, редица изследователи са извършили първоначалната екстракция с неутрални разтворители като 60% метанол, n-бутанол, студен ацетон, смеси ацетон / метанол / вода, или просто вода (Jackman et al., 1987). Установено е, че екстракцията с метанол е с 20% по-ефективна от етанол и 73% по-ефективен от водата, когато се използва за извличане на антоцианин от грозде.

Различни изследователи използват различни разтворители за екстрахиране на антиоксидантни съединения от различни растителни материали. Най-широко използваните разтворители за извличане фенолните вещества са метанол, ацетон и техните водни смеси, подкислени или не (Pinelo, Rubilar, Sineiro, & Nunez, 2004; Rubilar, Pinelo, Franco, Sineiro, & Nunez, 2003). Свойствата на екстрахиращите разтворители значително влияят на измереното общо съдържание на феноли (\pm 25% вариация) и антиоксидантна способност (до 30% вариация). Всички смеси на ацетон са извличали повече фенолни съединения, отколкото смесите на основата на метанол. В съответствие с тези резултати, Gonzalez-Montelongo, Lobo, и Gonzalez (2010) са показали, че водно ацетонова смес извлича пълноценно фенолите от бананова кора и произвежда екстракти с висок антиоксидантен потенциал. Използвани са различни температури на екстракция, варираща от 4 ° C (Tabart et al., 2007) до стайна температура (Kurilich, Jeffery, Juvik, Wallig, & Klein, 2002) или по-висока температура (Hinneburg & Neubert,

2005; Hu & Skibsted, 2002). По-висока температура може да бъде причина за частичното унищожаване на фенолни съединения, както вече беше съобщено за различни растителни материали (Barreira et al., 2009).

Изборът на ацетон като екстрагент, с последващо разделяне с хлороформ се основава на факта, че сместа хлороформ/ацетон разделя липофилните от хидрофилните съединения в екстракта, като по този начин дава възможност за концентриране на антоцианините в екстракционната смес и намалява етапите на допълнително пречистване. От друга страна, пречистването е необходимо, тъй като примесите в екстракционната смес могат да попречат на последващото определяне. Използването на подкислен ацетон като екстрахиращ разтворител ще осигури ниско рН, което благоприятства стабилността на антоцианините. Различни автори са използвали съотношения на ацетон / хлороформ, вариращи от 1: 1, 1: 2, 1: 2.4, дори до 1: 5. Установено е, че по-голямата пропорция на хлороформа намалява количеството на ацетон във водната фаза фаза и може да елиминира необходимостта от отстраняване ацетон чрез вакуум-изпаряване. Ниската температура от 30 ° до 40 ° C по време на вакуум- изпаряването е необходимо условие, за да се избегне разграждането на антоцианини. Суровият екстракт от антоцианини съдържа незначително количество солна киселина (0.01%), което благоприятства образуването на стабилен флавинов йон. Въпреки това, по време на концентрацията (и особено при сухо състояние) киселината може да причини хидролиза от лабилни ацилни групи, ко-пигменти или метални комплекси, които са важни за стабилността на антоцианините. Предимство на ацетон / хлороформения метод в сравнение с метанол и метанол/водният е, че антоцианиновата фракция не е замърсена с липофилни съединения.

Етапите на пречистване са важни за охарактеризирането на антоцианините. Отстраняването на интерфериращите съединения позволява по-надеждно разделяне чрез HPLC, мас спектрометрия и ЯМР по време на идентификацията на антоцианините в растителни екстракти. Твърдофазната екстракция се използва за адсорбиране на антоцианините и отстранява захари и органични киселини от екстракта. Колоните

C18 са приложими в дадения случай поради тяхната лекота на използване и висока ефективност за фракциониране на антоцианини. Ключов фактор при използването на тези почиствания техники е стабилността на антоцианините при използваните условия, както и лекотата извличане на антоцианините от колоната. Полифенолните съединения заедно с антоцианините имат афинитет към C18 колоната и се конкурират за местата на свързване.

2. Разработване, оптимизиране и валидиране на методи за фитохимичен анализ на фенолни съединения в растителни екстракти.

Оптимизиране и валидиране на метода за определяне на концентрацията на общи полифеноли в екстракти от плодове на *S.ebulus*.

Използван е спектрофотометричния метод, описан от J. Whitaker (Current Protocols in Food Analytical Chemistry, 2001) като приложим за определяне на общи полифеноли в горски плодове, като за нуждите на нашият експеримент бяха модифицирани и оптимизирани условията на анализа.

В епруетка се накапват 20 μl екстракт, 1580 μl дестилирана вода и 100 μl реактив на Folin-Ciocalteu, разреден *ex tempore* с дестилирана вода в съотношение 1:10. След 5 минути се прибавя 300 μl Na_2CO_3 . реакционната смес се инкубира 2 часа на тъмно при температура 25 ± 1 C. Отчита се абсорбцията при 765 nm. Изготвя се празна проба без екстракт. Абсорбцията се изчислява по формулата:

$$A=A \text{ проба} - A \text{ празна проба}$$

Концентрацията на полифенолите е определена по метода на външната калибровка. Като стандарт е използвана галова киселина за построяването на калибровъчна графика. За целта са приготвени стандартни разтвори с концентрации (10 – 650 $\mu\text{g/mL}$), които са анализирани според описаната аналитична процедура. Съдържанието на полифеноли е представено като mg еквиваленти галова киселина на 1g растителен материал. Измерванията са извършени на спектрофотометър CamSpec M501.

Уравнение на калибровъчната права: $y = 0.0007728x - 0.005631$

Линейност на калибровъчната права: $r^2 = 0.9982$

Валидиране на метода:

Параметър	Метод за количествено определяне на общи полифеноли		
	Фракция след екстракция със 70% ацетон	Хидрофилна фракция	Фракция антоцианини след SPE
Прецизност:	5.98%	1.83%	5.43%
<ul style="list-style-type: none"> Повторяемост RSD% 	10.79%	3.66%	5.32%
<ul style="list-style-type: none"> Междинна прецизност RSD% 			
Линеен обхват	10 – 650 µg/mL		
LOD	2.5 µg/mL		
LOQ	7.5 µg/mL		

В Таблица 1 подолу са представени резултатите за съдържанието на полифеноли в получените фракците на изследваните групи плодове на *Sambucus ebulus*. Стойностите са представени в [mg/l] ± SD.

Таблица 1. Съдържанието на полифеноли в получените фракците на изследваните групи плодове на *Sambucus ebulus*. Стойностите са представени в [mg/l] ± SD.

	Sambucus ebulus 1	Sambucus ebulus 2	Sambucus ebulus 3	Sambucus ebulus 4	p value 1 vs. 3
Тотален екстракт	522.80 ± 4,83	490.00 ± 0,97	174.60 ± 5,96	198.30 ± 1,93	< 0.0001

Хидрофилна фракция	502.30 ± 6.26	444.40 ± 3.62	163.20 ± 4.18	180.10 ± 7.77	< 0.0001
Антоцианинова фракция	395.60 ± 2.90	376.50 ± 7.73	140.00 ± 1.37	136.80 ± 5.80	< 0.0001

S. ebulus 1-замразен плод,м. Шкорпиловци; S.ebulus 2 – замразен от м. Боровец; S.ebulus 3 – сух от м. Шкорпиловци , S.ebulus 4 – сух от Талодерма ООД. За всяка проба са извършени по 3 паралелни анализа.

Оптимизиране и валидиране на метод за количествено определяне на концентрацията на флавоноиди в екстракти от плодове на S.ebulus.

Използван е метода на Zhishen et al., 1999 като за целите на изследването са оптимизирани следните параметри: количество на пробата, съотношение проба/NaNO₂/AlCl₃.

Отпипетират се 250 µl от пробата в епруетка. Прибавят се 1000 µl дейонизирана вода и 75µl 5% NaNO₂. Разбърква се на Vortexмиксер и се инкубира за 5 минути на стайна температура на тъмно?. Прибавят се 75 µl AlCl₃ , отново се разбърква и се инкубира за 6 минути на стайна температура, след което се прибавя 500 µl NaOH и 600 µl дейонизирана вода. Разбърква се и абсорбцията се измерва след 15 минути при λ = 510 nm срещу празна проба. Измерванията се правят на 3 паралелни проби Абсорбцията се изчислява по формулата:

$$A = A \text{ проба} - A \text{ празна проба}$$

Концентрацията на флавоноидите в пробата се определя по метода на външната калибровка. Пригответи са серия стандартни разтвори на рутин в етанол със следните концентрации (20 – 800 µg/mL). Построена е калибровъчна графика като на ординатата е нанесена оптичната плътност , а на абсцисата концентрацията на стандарта в µg/mL. Общото съдържание на флавоноиди в пробите е представено като мг рутинови еквиваленти/грам свежо /сухо тегло. Измерванията са извършени на спектрофотометър Сamspec M501.

Уравнение на калибровъчната права: $y = 0.001170x - 0.01354$

Линейност на калибровъчната права: $r^2 = 0.9900$

Валидиране на метода:

Параметър	Метод за количествено определяне на общи флавоноиди		
	Фракция след екстракция със 70% ацетон	Хидрофилна фракция	Фракция антоцианини след SPE
Прецизност:	3.33%	3.51%	2.48%
<ul style="list-style-type: none"> Повторяемост RSD% Междинна прецизност RSD% 	2.54%	4.22%	5.32%
Линесен обхват	20 – 800 µg/ml		
LOD	5.64 µg/ml		
LOQ	17.09 µg/ml		

В Таблица 2 подолу са представени резултатите за съдържанието на флавоноиди в получените екстракти на изследваните групи плодове на *Sambucus ebulus*. Стойностите са представени в [mg/l] ± SD.

Таблица 2. Съдържанието на флавоноиди в получените екстракти на изследваните групи плодове на *Sambucus ebulus*. Стойностите са представени в [mg/l] ± SD.

	Sambucus ebulus 1	Sambucus ebulus 2	Sambucus ebulus 3	Sambucus ebulus 4	p value 1 vs. 3
Тотален екстракт	630.20 ± 7,25	492.90 ± 4,93	189.20 ± 3,38	144.80 ± 2,56	< 0.0001

Хидрофилна фракция	551.30±14.50	369.50 ± 9.52	127.70 ± 8.67	87.27 ± 2.75	< 0.0001
Антоцианинова фракция	402.30 ± 6.04	252.20 ± 7.75	98.95 ± 2.15	34.29 ± 2.61	< 0.0001

S.ebulus 1-замразен от м. Шкорпиловци; S.ebulus 2 – замразен от м. Боровец; S.ebulus 3 – сух от м. Шкорпиловци, S.ebulus 4 – сух от Талодерма ООД. За всяка проба са извършени по 3 паралелни анализа.

Оптимизиране и валидиране на метода за количествено определяне на антоцианинови пигменти в екстракти от плодове на S.ebulus.

Аналитична процедура:

Използвана е процедурата, описана от J. Whitaker, Current, 2001.

Определя се подходящия коефициент на разреждане на пробата като се използва 0,025 М КСl буфер с рН 1,01, докато абсорбцията на при $\lambda_{vis-max}$ е в линейния диапазон на спектрофотометъра (за повечето спектрофотометри абсорбцията трябва да бъде по-малка от 1,2). Разделя се крайния обем на пробата на началния обем, за да се получи фактора на разреждане (ФР). За да не се надвишава капацитета на буфера, пробата не трябва да надвишава 20% от общия обем.

Приготвят се две разреждания на пробата, едно с буфер с рН 1,01 и второ с буфер с рН 4,5. Разбъркват се на Vortex-миксер и се инкубират 15 минути при стайна температура. Измерва се абсорбцията на всяко от разрежданията при $\lambda=510$ nm и $\lambda=700$ nm срещу дестилирана вода. Измерванията са извършени на спектрофотометър Samspec M501.

Изчислява се абсорбцията на разредената проба (A):

$$A = (A_{510}-A_{700})_{pH\ 1,01} - (A_{510}-A_{700})_{pH\ 4,5}$$

Концентрацията на мономерния антоцианинов пигмент в пробата се изчислява по следната формула:

$$\text{Мономерен антоцианинов пигмент (mg/L)} = (A \times M \times \text{ФР} \times 1000) / (\epsilon \times l),$$

където: М- молекулното тегло на антоцианинов пигмент
 ФР – фактора на разреждане
 ε - моларния абсорбционен коефициент на антоцианиновия пигмент

В таблица 3 подолу са представени резултатите за съдържанието на мономерни антоцианинови пигменти в получените фракците на изследваните групи плодове на *Sambucus ebulus*. Стойностите са представени в [mg/L] ± SD.

Валидиране на метода:

Параметър	Метод за количествено определяне на антоцианини		
	Фракция след екстракция със 70% ацетон	Хидрофилна фракция	Фракция антоцианини след SPE
Прецизност:			
• Повторяемост RSD%	8.46%	5.45%	6.61%
• Междинна прецизност RSD%	11.57%	6.70%	12.81%

Таблица 3. Съдържанието на мономерни антоцианинови пигменти в получените фракците на изследваните групи плодове на *Sambucus ebulus*. Стойностите са представени в [mg/L] ± SD.

	Sambucus ebulus 1	Sambucus ebulus 2	Sambucus ebulus 3	Sambucus ebulus 4	p value 1 vs. 3
Тотален екстракт	161.97 ± 0,80	125.16 ± 2,33	22.60 ± 0,81	13.19 ± 1,99	< 0.0001
Хидрофилна фракция	148.12 ± 4.62	117.47 ± 1.33	21.32 ± 0.63	12.22 ± 0.94	< 0.0001
Антоцианинова фракция	140.02 ± 4.93	129.50 ± 3.72	18.48 ± 0.25	10.72 ± 1.22	< 0.0001

S. ebulus 1-замразен от м. Шкорпиловци; S. ebulus 2 – замразен от м. Боровец; S. ebulus 3 – сух от м. Шкорпиловци, S. ebulus 4 – сух от Талодерма ООД. За всяка проба са извършени по 3 паралелни анализа.

От получените резултати се вижда, че най-високо съдържание на тотални полифеноли има в общият екстракт на замразените плодове от м. Шкорпиловци ($522.8 \pm 4,83 \text{ mg/L}$), следвани от замразените плодове от м. Боровец ($490 \pm 0,97 \text{ mg/L}$), а най-ниско е полифенолното съдържание в плодовете от „Талодерма“ ООД ($198.3 \pm 1,933 \text{ mg/L}$) - сушени в сушилни. Същата тенденция се запазва и в съдържанието на тотални полифеноли при последващото пречистване до получаване на антоцианиновата фракция.

По отношение на съдържанието на общи флавоноиди в екстрактите и получените фракции отново най-високо съдържание беше отчетено в замразените плодове от м. Шкорпиловци ($630.2 \pm 7,25 \text{ mg/L}$) и най-ниско в сушените плодове от Талодерма ООД ($144.8 \pm 2,56 \text{ mg/L}$), като тенденцията в процеса на пречистване отново се запазва.

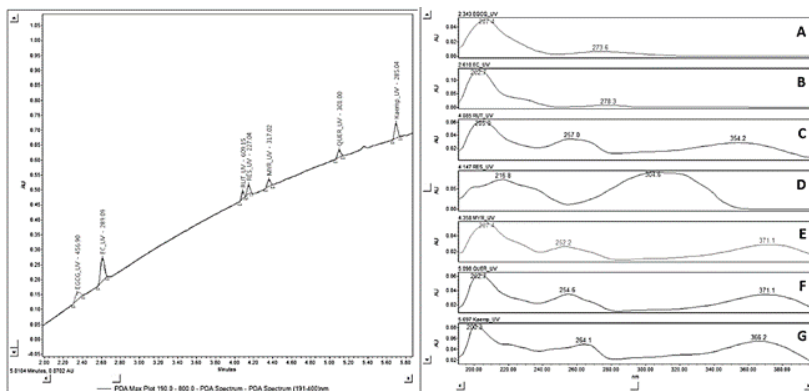
От таблица 3, представяща резултатите от анализа на съдържанието на общи мономерни антоцианинови пигменти в получените фракции, става ясно, че най-високо количество антоцианини се съдържа отново в замразените плодове от м. Шкорпиловци ($161.97 \pm 0,80 \text{ mg/L}$), което в процеса на пречистване намалява с 25%. Статистическа значима разлика по отношение на получените резултати и по трите показателя ($p < 0,0001$) беше установена при сравняване резултатите, получени за замразените и изсушени плодове събрани от една и съща месност, което показва, че съществува зависимост между начина на съхранение на плодовете и съдържанието на биологично активни съединения в тях.

Разработване и валидиране на UPLC-UV-MS метод за количествено определяне на фенолни съединения в растителни екстракти.

Разработването на метода се основава на следната аналитична стратегия: информация за структурата и физикохимичните свойства на анализите, избор на аналитичен метод, оптимизация и валидиране на метода.

Оптимизиране на аналитичните условия на метода

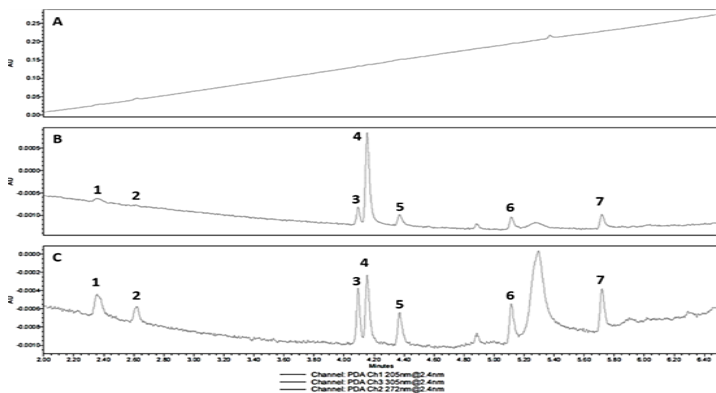
На фигура 5 са дадени абсорбционните максимуми на изследваните полифеноли, получени в режим max-plot на PDA детектора.



Фигура 1. Хроматограма и абсорбционни спектри на стандартен разтвор от изследваните полифеноли

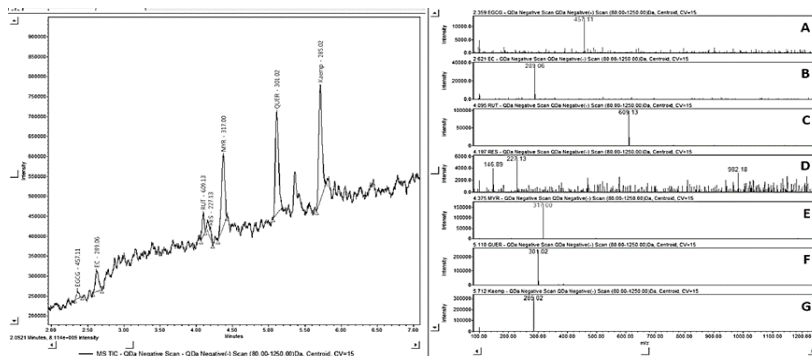
Пробата е сканирана в обхват 191-400nm. Концентрацията на изследваните полифеноли в стандарта 0.25 g/L. А - епикатехин λ_{max} = 207nm и 274nm; В – епигалокатехин галат λ_{max} = 203nm and 278nm; С - резвератрол λ_{max} = 205nm, 257nm, 354nm; D - рутин λ_{max} = 217nm, 305nm; Е - мирицетин λ_{max} = 207nm, 252nm, 371nm; F - кверцетин λ_{max} = 203nm, 255nm, 371nm; G - кемпферол λ_{max} = 200nm, 264nm, 366nm.

Въз основа на абсорбционните максилуми на аналитите са избрани три дължини на вълната за провеждане на хроматографското разделяне: 205 nm, 305 nm и 272 nm (Фиг. 2).



Фигура 2. Хроматограми на стандарт, съдържащ изследваните полифеноли при три дължини на вълната 205 nm, 305 nm и 272 nm, съответстващи на абсорбционните максимуми на анализите. Концентрацията на полифенолите в стандарта е 0.25mg/L. А – $\lambda = 205\text{nm}$; В – $\lambda = 305\text{nm}$; С – $\lambda = 272\text{nm}$. 1 – епигалокатехин галат; 2 - епикатехин; 3 - рутин; 4 - ресвератрол; 5 - мирицетин; 6 - кверцетин; 7 – кепферол.

От фигурата е видно, че рутин (3) и ресвератрол (4) имат много близки времена на задържане 4.092 и 4.158 мин. и поради това те се не се разделят добре с PDA детектора. Същите съединения имат m/z стойности съответно 609.13 и 227.05, което дава възможност за тяхната селективна идентификация и количествено определяне

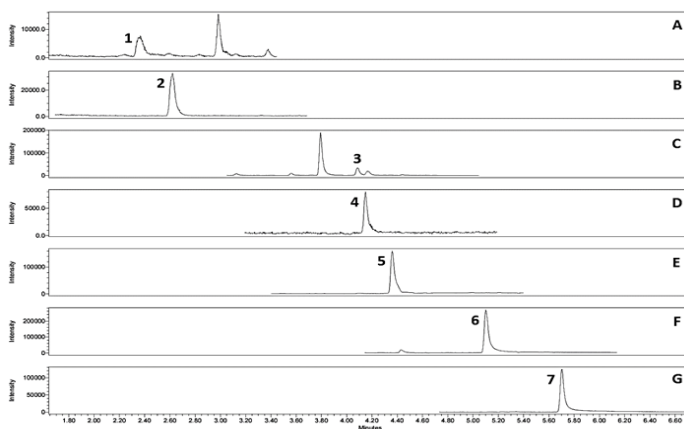


Фигура 3. Обща йонна хроматограма на стандартен разтвор от изследваните полифеноли

Концентрация на полифенолите в стандартния разтвор е 0.25 g/L. Сканирането по маси е извършено в негативен режим от 80 – 1250 Da.

A - епикатехин $m/z = 457.11$; B – епигалокатехин галат $m/z=289.06$; C - рутин $m/z = 609.13$; D - резвератрол $m/z = 227.13$; E - мирицетин $m/z = 317.0$; F - кверцетин $m/z = 301.02$; G - кемпферол $m/z = 285.02$.

. Всички други тествани полифеноли имат достатъчно различаващи както времена на задържане, така и m/z стойности и могат да бъдат селективно определени при условията на анализа (Фиг. 3). На фигура 4 е представена LC-MS хроматограма на проба общ екстракт от плодове на *Sambucus ebulus* със стандартна добавка в концентрация 0.75 mg/L. При описаните условия на метода всички тествани полифеноли са добре разделени.



Фигура 4. LC-MS на проба общ екстракт от плодове на *Sambucus ebulus* със стандартна добавка в концентрация 0.75 mg/L.

A - m/z 457.15: 1 – епигалокатехин галат RT 2.368, B - m/z 289.12: 2 – епикатехин RT 2.624; C - m/z 609.19: 3 – рутин RT 4.092; D - m/z 227.18: 4 – резвератрол RT 4.158; E - m/z 317.07: 5 – мирицетин RT 4.366; F - m/z 301.06: 6 – кверцетин RT 5.104; G m/z 285.02: 7 – кемпферол RT 5.704.

Валидиране на метода

Линейност

Беше установена добра линейност на метода за калибриране както на разтворител, така и на матрица. За калибриране на разтворителя мето-

дът е линеен за всички тествани полифеноли до поне 50 mg/L. Регресионните уравнение и коефициентите на корелация (R^2), използвани за оценка на линейността на метода за всеки от тестваните полифеноли в разтвор и в матрица при съответните концентрации са представени на таблица 4.

Таблица 4. Регресионни уравнение и коефициенти на корелация (R^2) за всеки от тестваните полифеноли при съответните концентрации

Аналит	Калибровка в разтвор			Калибровка в матрица
	0.05-0.5 mg/L	0.5-5 mg/L	5-50 mg/L	0.05-1.4 mg/L
EGC	$Y=7.24e+003X-1.51e+002$ ($R^2=0.9953$)	$Y=9.64e+003X-1.70e+003$ ($R^2 = 0.9979$)	$Y=1.44e+004X-3.79e+004$ ($R^2 = 0.9950$)	$Y=4.15e+004X-1.86e+003$ ($R^2 = 0.9962$)
EC	$Y=1.75e+004X-4.97e+000$ ($R^2=0.9971$)	$Y=2.18e+004X-3.710e+003$ ($R^2= 0.9980$)	$Y=2.06e+004X+2.35e+004$ ($R^2 = 0.9973$)	$Y=5.58e+004X-1.23e+003$ ($R^2 = 0.9977$)
RUT	$Y=1.65e+004X+1.98e+002$ ($R^2=0.9971$)	$Y=2.18e+004X-3.47e+003$ ($R^2 = 0.9961$)	$Y=2.28e+004X+8.04e+003$ ($R^2 = 0.9955$)	$Y=1.09e+005X+3.14e+003$ ($R^2 = 0.9987$)
RES	$Y=5.00e+005X-3.95e+003$ ($R^2=0.9983$)	$Y=4.59e+005X+2.33e+004$ ($R^2 = 0.9990$)	$Y=3.30e+005X+9.40e+005$ ($R^2 = 0.9974$)	$Y=2.38e+004X-5.32e+001$ ($R^2 = 0.9970$)
MYR	$Y=1.71e+005X-1.45e+003$ ($R^2 = 0.9954$)	$Y=1.79e+005X+2.10e+003$ ($R^2 = 0.9986$)	$Y=9.10e+004X+6.88e+005$ ($R^2 = 0.9957$)	$Y=4.71e+005X-1.29e+004$ ($R^2 = 0.9972$)
QUE	$Y=5.10e+004X-6.19e+002$; ($R^2 = 0.9974$)	$Y=7.26e+004X-1.64e+004$; ($R^2 = 0.9982$)	$Y=4.75e+004X+1.88e+005$; ($R^2 = 0.9960$)	$Y=5.30e+005X-1.58e+004$; ($R^2 = 0.9972$)
КАЕМР	$Y=3.61e+004X-4.46e+002$; ($R^2=0.9971$)	$Y=5.45e+004X-9.69e+003$; ($R^2=0.9965$)	$Y=3.78e+004X+1.02e+005$; ($R^2=0.9971$)	$Y=2.88e+005X-1.29e+004$; ($R^2 = 0.9978$)

Граница на откриване (LOD) и количествено определяне (LOQ)

Установена е граница на откриване за всички изследвани полифеноли 0,05 mg/L с изключение на мирицетин, за който тя е 0.015 mg/L. Границата на количествено определяне е 0.05 mg/L за мирицетин и 0.1 mg/L за останалите полифеноли.

Точност и прецизност

Таблица 5 представя точността и прецизността на настоящия метод за проби от тотални екстракти, приготвени, както е описано в раздел "Процедура на екстракция" и добавени със стандартни количества от тестваните полифеноли. Не се наблюдава нежелан масов пренос след инжектиране на стандарт с концентрация 50 mg/L.

Таблица 5. Точност и прецизност на разработения LC-PDA-QDa метод за анализ на полифеноли в екстракт от плодове на *Sambucus ebulus*.

Аналит	Прицелна концентрация (mg/L)	Повтаряемост (n=9)			Междинна прецизност (n=3)		
		Измерена концентрация mean \pm SD	Точност (%)	RSD (%)	Измерена концентрация mean \pm SD	Точност (%)	RSD (%)
EGCG	0.05	0.045 \pm 0.005	89.1	4.9	0.050 \pm	100.4	8.5
	0.5	0.413 \pm 0.019	82.5	3.2	0.004	91.1	6.7
	1.0	0.882 \pm 0.043	88.2	4.0	0.455 \pm 0.030 0.939 \pm 0.067	93.9	7.1
EC	0.05	0.045 \pm 0.016	90.0	1.3	0.052 \pm	104.0	4.9
	0.5	0.433 \pm 0.029	86.7	0.9	0.003	106.0	4.5
	1.0	0.937 \pm 0.041	93.7	2.5	0.530 \pm 0.024 1.004 \pm 0.063	100.4	6.3
RUT	0.05	0.046 \pm 0.005	91.5	2.3	0.052 \pm	104.2	11.7
	0.5	0.408 \pm 0.024	81.6	2.9	0.006	86.7	3.8
	1.0	0.948 \pm 0.038	94.8	2.9	0.434 \pm 0.016 0.984 \pm 0.036	98.4	3.7
RES	0.05	0.052 \pm 0.006	104.1	2.7	0.050 \pm	100.0	13.0
	0.5	0.471 \pm 0.012	94.3	2.1	0.006	100.6	5.6
	1.0	1.003 \pm 0.016	100.3	1.1	0.503 \pm 0.028 0.961 \pm 0.087	96.1	9.0
MYR	0.05	0.059 \pm 0.002	117.9	2.4	0.048 \pm	95.2	4.2
	0.5	0.483 \pm 0.012	96.7	2.7	0.002	103.6	2.4

	1.0	0.984±0.020	98.4	2.1	0.518 ± 0.012 1.004 ± 0.025	100.4	2.5
QUER	0.05	0.041±0.003	82.2	0.7	0.052 ±	104.7	6.6
	0.5	0.486±0.014	97.3	2.2	0.004	104.5	4.7
	1.0	0.969±0.047	96.9	1.7	0.522 ± 0.025 1.011 ± 0.048	101.1	4.8
КАЕМР	0.05	0.056±0.002	112.1	1.0	0.050 ±	100.1	3.0
	0.5	0.480±0.009	95.9	1.9	0.002	110.8	3.1
	1.0	0.972±0.029	97.2	4.5	0.554 ± 0.017 0.981 ± 0.021	98.1	2.2

Всяка проба е анализирана трикратно.

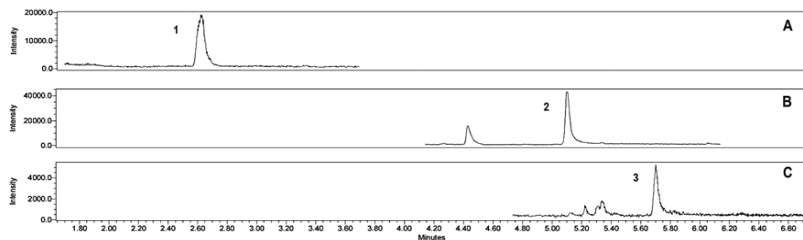
EGCG – епигалокатехин галаг; ЕС – епикатехин; RUT - рутин; RES - резвератрол; MYR - мирицетин; QUER - кверцетин; КАЕМР - кемпферол

Селективност

Селективността е оценявана чрез използване на UV и мас-селективния детектор. От фиг. 8 и фиг. 9 се вижда, че няма интерфериращи пикове с тези на изследваните полифеноли в екстракта. Освен това, за оценка на селективността са сравнявани абсорбционните спектри на всеки от изследваните полифеноли в стандартен разтвор и в матрица (с и без добавка) с тези на съответните стандартни субстанции.

Анализ на проби от екстракт на плодове от *Sambucus ebulus*

Разработеният аналитичен метод е апробиран за анализ на общ екстракт от плодове на *Sambucus ebulus*. Пробоподготовката е извършена както е описано в т. "Екстракционна процедура". LC-MS хроматограмата е представен на Фигура 5.



Фигура 5. LC-MS хроматограма на общ екстракт от плодове на *Sambucus ebulus*

A - m/z 289.12: 1 – епикатехин RT 2.624; B - m/z 301.06: 2 – кверцетин RT 5.104; C m/z 285.02: 3 – кемпферол RT 5.704

От хроматограмата се вижда, че методът добре разделя интересуващите ни полифеноли в пробите екстракт. Съдържанието на изследваните полифеноли е представено в mg/100g свежо тегло (FW). Установени са 0.84 mg/100 g FW епикатехин, 0.15 mg/100 g FW кверцетин и 0.05 mg/100 g FW кемпферол в общия екстракт от плодове на *Sambucus ebulus*.

Обсъждане

Разработване и оптимизиране на метода

Повечето хроматографски методи за анализ на полифеноли в екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* включват обратнофазова течна хроматография с UV/Vis детектор или такъв с диодна матрица (PDA) (Anton et al., 2013; Cvetanovic et al., 2016; Huang et al., 2012; Nour et al., 2013; Shokrzadeh et al., 2010). Хроматографски методи с мас-селективна детекция от типа троен квадрупол LC-MS/MS са разработени за анализ на терпенови триалкони в *Ginkgo biloba* (Sora et al., 2009), фенолни киселини и флавоноиди в какао на прах (Ranneh et al., 2015), флавоноиди в екстракти от имел (Pietrzak et al., 2017), фенолни киселини и флавоноиди в екстракти от *Ocimum basilicum* чрез HPLC-MS с йонен капан (Benedec et al., 2012). Бърз и точен хроматографски метод с комплементарно използване на два детектора PDA и мас-селективен от типа единичен квадрупол за определяне на полифеноли в екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* не намерихме в достъпната литература.

Разработеният хроматографски метод комбинира както PDA, така и мас-спектрометрична детекция. С него могат едновременно и бързо (за 15 мин.) да се идентифицират и определят количествено седем полифенолни съединения (епикатехин, епигалокатехин галат, рутин, ресвератрол, мирицетин, кверцетин и кемпферол) с необходимата точност, прецизност и селективност.

За определянето и откриването на полифенолните съединения са използвани два детектора, работещи в паралел, UV (PDA) и единичен квадруполен мас-детектор (QDa). С маселективния детектор са осъществявани идентификацията и количественият анализ на анализите, докато PDA детекторът е използван за потвърждение. За оптимизиране на хроматографското разделяне на анализите, в съответствие с техните абсорбционни максимуми са избрани три дължини на вълната 205 nm, 305 nm и 272 nm. Всички изследвани полифенолни съединения са успешно разделени и показват най-добър сигнал при 272 nm. Подобни резултати са докладвани от Nour et al., 2013, които също са тествали три дължини на вълната (254 nm, 278 nm, 300 nm) за разделяне на фенолни киселини и флавоноиди в екстракти от листа на орех с общо време на хроматографския анализ 70 минути. Цитираните автори идентифицират анализите по време на задържане, докато в представения от нас метод идентификацията е по-селективна и прецизна, с използване на отношението m/z на съответните молекулни йони. Освен това, с разработения от нас метод хроматографския анализ е бърз като пълно разделяне на полифенолите се постига за 15 min.

Разработеният хроматографски метод е линеен в широк диапазон на концентрация от 0.05 mg/L до 50 mg/L и показва добра линейност за седемте изследвани полифенола както в разтвор, така и в матрица ($R^2 > 0.996$). Вариациите при измерване на прецизността на метода при 3 концентрации са под 15%. Възпроизводимостта за всички тествани полифеноли е по-висока от 95% за най-ниската и за най-високата прицелна концентрация, което доказва точността на метода.

В обобщение, данните от валидирането на разработения хроматографски метод за идентификация и количествено определяне на седем полифенола в екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* показват, че той е бърз, прецизен, точен и селективен.

Определяне на полифенолен състав на екстракт от плодове на Sambucus ebulus с разработения метод

С разработения LC-PDA-MS метод в тотален ацетонов екстракт от зрели плодове на *Sambucus ebulus* се определят три полифенолни съединения - епикатехин (0.84 mg/100 g FW), кверцетин (0.15 mg/100 g FW) и кемпферол (0.05 mg/100g FW). Сред тях епикатехин е в най-голяма концентрация, следван от кверцетин и кемпферол. Има много малко публикации, представящи данни за фитохимичния състав на плодовете от *Sambucus ebulus*. Anton et al., 2013 съобщават, че основните фенолни съединения в метанолен екстракт от плодове на *Sambucus ebulus* са хиперозид (1,60 mg/100 g FW) и рутин (1,20 mg/100 g FW). С разработения хроматографски метод в тотален екстракт ние не откриваме рутин, но установяваме сравнително големи количества епикатехин. Като се има предвид, че методът на екстракция оказва значително влияние върху вида на екстрахираните биоактивни съединения, посочената разлика не е изненадваща (Topuzovic et al., 2016; Gitin et al., 2012). След кисела хидролиза на екстракта, други автори откриват 0.57 ± 0.05 mg/100 g FW кемпферол и 0.49 ± 0.08 mg/100 g FW кверцетин (Anton et al., 2013). Поради по-високата чувствителност и селективност на разработения от нас хроматографски метод, ние доказваме малки количества свободен кверцетин и кемпферол (De Villiers et al. 2016).

3. Антиоксидантната активност на получените екстракти

Антиоксидантната активност на екстрактите беше оценена по два метода за *in vitro* определяне (ABTS и DPPH). В настоящото изследване беше направена оценка за сравнение между двата метода, както и обсъждане на техните предимства и недостатъци.

В таблица 6 са представени стойностите на антиоксидантния капацитет на получените фракции от изследваните групи плодове на бъзак определени чрез ABTS метода.

Таблица 6. Антиоксидантна активност на получените фракции.

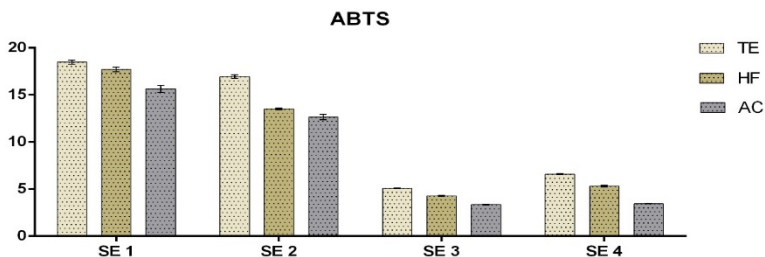
TEAC [mM UAE] ± SD	Sambucus ebulus 1	Sambucus ebulus 2	Sambu- cus ebu- lus 3	Sambu- cus ebu- lus 4	p value 1 vs. 3

Тотален екстракт	18,49 ±0,21	16,96 ± 0,19	5,07 ± 0,04	6,60 ±0,05	< 0.0001
Хидрофилна фракция	17.71 ±0.25	13.52 ± 0.09	4.28 ± 0.04	5.31 ± 0.09	< 0.0001
Антоцианинова фракция	15.64 ±0.36	12.65 ± 0.29	3.35 ± 0.06	3.44 ± 0.02	< 0.0001

S.ebulus 1-замразен от м. Шкорпиловци; *S.ebulus* 2 – замразен от м. Боровец; *S.ebulus* 3 – сух от м. Шкорпиловци , *S.ebulus* 4 – сух от Талодерма ООД. За всяка проба са извършени по 3 паралелни анализа.

Измежду четирите изследвани групи плодове с най-висока антиоксидантна активност се отличават и трите фракции на замразените плодове от м.Шкорпиловци (ТЕ - 18,49 ±0,21; ХФ – 17,71 ±0,25; АФ – 15,64 ±0,36) , следвани от замразените плодове от м.Боровец (ТЕ – 16,96 ± 0,19; ХФ – 13,52 ± 0,09; АФ – 12,65 ± 0,29).

Най-висока АОА (18.49±0.21 mM UAE) притежава ТЕ от замразените плодове на *S.ebulus* от м.Шкорпиловци (SE1). Подобни свойства показва и ТЕ от замразените плодове събрани от м. Боровец (SE2) (17.71±0.25 mM UAE). Тоталните екстракти, получени от изсушените плодове показват АОА почти три пъти по-ниска от тази на другите две групи (SE3 5.07±0.04 mM UAE; SE4 6.60±0.05 mM UAE). АОА намалява с еднаква зависимост в процеса на пречистване на екстрактите, до получаване на АЦФ.



Фигура 6. АОА в екстракти от плодове на бъзак и получените от тях фракции. Резултатите са представени $\pm SD$. Представени са средните стойности за всяко едно измерване $\pm SD$.

SE 1-замразен от м. Шкорпиловци; SE 2 – замразен от м. Боровец; SE 3 – сух от м. Шкорпиловци; SE 4 – сух от Талодерма ООД. За всяка проба са извършени по 3 паралелни анализа.

Таблица 7. Антиоксидантна активност, концентрация на тотални полифеноли, тотални флавоноиди и тотални мономерни антоцианини.

	АОА [mM UAE]	ТП [mg/l]	ТФ [mg/l]	ТМА [mg/l]	%ТМА от ТП	
SE1	TE	18.49 \pm 0.21	522.80 \pm 4.83	630.20 \pm 7.25	161.97 \pm 0.80	30.83
	XФ	17.71 \pm 0.25	502.30 \pm 6.26	551.30 \pm 14.50	148.12 \pm 4.62	29.49
	АЦФ	15.64 \pm 0.36	395.60 \pm 2.90	402.30 \pm 6.04	140.02 \pm 4.93	35,39
SE2	TE	16.96 \pm 0.19	490.00 \pm 0.97	492.90 \pm 4.93	129.50 \pm 3.72	26.43
	XФ	13.52 \pm 0.09	444.40 \pm 3.62	369.50 \pm 9.52	125.16 \pm 2.33	28.24
	АЦФ	12.65 \pm 0.29	356.50 \pm 7.73	252.20 \pm 7.75	117.47 \pm 1.33	32.65
SE3	TE	5.07 \pm 0.04	174.60 \pm 5.96	189.20 \pm 3.38	22.60 \pm 0.81	12.94
	XФ	4.28 \pm 0.04	163.20 \pm 4.18	127.70 \pm 8.67	21.32 \pm 0.63	13.06
	АЦФ	3.35 \pm 0.06	140.00 \pm 1.37	98.95 \pm 2.15	18.48 \pm 0.25	13.20
SE4	TE	6.60 \pm 0.05	198.30 \pm 1.93	144.80 \pm 2.56	13.19 \pm 1.99	6.65

ХФ	5.31±0.09	180.10±7.77	87.27±2.75	12.22±0.94	6.78
АЦФ	3.44±0.02	136.80±5.80	34.29±2.61	10.72±1.22	7.45

Резултатите са представени като средна стойност±SEM. За всяка проба са извършени по 3 паралелни анализа. АОА – антиоксидантна активност; ТП – тотални полифеноли; ТФ – тотални флавоноиди; ТМА – тотални мономерни антоцианинови пигменти; ТЕ – тотален екстракт; ХФ – хидрофилна фракция; АЦФ – антоцианинова фракция; SE 1-замразен от м. Шкорпиловци; SE 2 – замразен от м. Боровец; SE 3 – сух от м. Шкорпиловци; SE 4 – сух от Талодерма ООД

Най-висока АОА (18.49±0.21 mM UAE) и съдържание на ТП (522.80±4.83 mg/L) притежава ТЕ от замразените плодове на *S.ebulus* от м.Шкорпиловци. За плодовете със същия произход беше установено и най-високо съдържание на ТФ (630.20±7.25 mg/L), както и на ТМА (161.97±0.80 mg/L). В процеса на пречистване в получената АЦФ от същите плодове беше установено най-високо процентно съдържание на ТМА (35,39%) от общото съдържание на ТП в тях

С DPPH метода се оценява способността на антиоксидантите, съдържащи се в анализираните тотален екстракт и антоцианинова фракция, да встъпват директно в реакция с DPPH радикала, като се проследява промяната в абсорбцията при дължина на вълната 517 nm. За целта на нашето изследване е модифициран метода на Brand-Williams et al., 1995.

Към 10 µl аликвотна част от тестовата проба (в метанол) се добавя към 190 µl 1 mM разтвор на DPPH в метанол. Сместа се разбърква на вортекс-миксер за 1 min и след това се инкубира при стайна температура в продължение на 30 min на тъмно. Абсорбцията се отчита при 517 nm на многофункционален четец Synergy 2 (BioTek). Концентрацията на DPPH радикала е определена с използване на Trolox като стандарт За целта са приготвени стандартни разтвори на Trolox в метанол с концентрации (100, 200, 400, 600, 800, 1000 µM), които са анализирани по описаната аналитична процедура. Построена е

калибровъчна графика, като на абсцисата е нанесена концентрацията на стандартите в μM , а на ординатата оптичната плътност.

Намаляването на абсорбцията е в линейна зависимост от концентрацията на антиоксиданта. Процентното инхибиране на DPPH радикала се определя съгласно следната формула. Процентът на инхибиране се изчислява по следната формула:

$$\% \text{ DPPH} = 1 - (A_{\text{проба}} - A_{\text{празна проба}} / A_{\text{контрола}} - A_{\text{празна проба}}) \times 100,$$

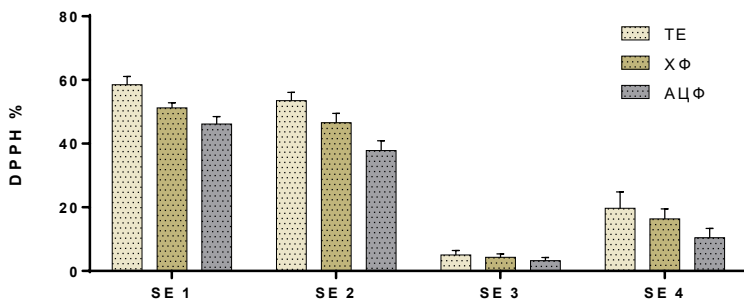
където, $A_{\text{проба}}$ - абсорбцията на пробата (проба + DPPH)

$A_{\text{празна проба}}$ - абсорбцията на празната проба (метанол + DPPH)

$A_{\text{контрола}}$ – абсорбцията на чистия метанол

Антиоксидантната активност на ТЕ и АЦФ се обяснява със способността на фенолните съединения, съдържащи се в тях да действат като редуциращи агенти. Фенолните съединения, поради своята структурна особеност – наличие на фенолни хидроксилни групи, имат радикал- захващаща активност (фиг 7).

И в четирите анализирани групи плодове се наблюдава плавно понижение на DPPH радикал почистващата активност в процеса на пречистване на екстракта. ТЕ, получен от замразените плодове от м. Шкорпиловци (SE1) в най-висок процент погасява DPPH радикала (59%), като АЦФ фракция, получена при пречистването му понижава радикал почистващата си активност с 12% спрямо ТЕ. В по-висок процент намалява почистващата активност при АЦФ – с 16%, получена от пречистването на ТЕ от замразени плодове от м. Боровец (SE2). Сухите плодове със същия произход (SE3) проявяват много по-ниска радикал почистваща активност в сравнение със замразените с близо 50%. За групата изследвани сухи плодове от Талодерма ООД процента погасяване на DPPH радикала от ТЕ е 20%, който в процеса на пречистване намалява наполовина (10%).



Фигура 7. АОА в екстракти от плодове на бъзак и получените от тях фракции. Резултатите са представени като средна стойност±SEM.

За всяка проба са извършени по 3 паралелни анализа. SE 1-замразен от м. Шкорпиловци; SE 2 – замразен от м. Боровец; SE 3 – сух от м. Шкорпиловци; SE 4 – сух от Талодерма ООД

За да се оцени зависимостта между съдържанието на ТП в различните фракции, получени от плодове на *Sambucus ebulus* и радикал-захващащата им активност, оценена чрез степента на неутрализиране на стабилния радикал DPPH (α -дифенил- β -пикрилхидразил) бе извършен корелационен анализ. В процеса на пречистване на ТЕ се наблюдава слабо понижение на DPPH радикал захващащата активност. Установява се силна положителна корелация между радикал-захващащата активност и съдържанието на фенолни съединения в трите изследвани фракции (фиг. А,Б,В). Най-силно изразена е причинно-следствената връзка между радикал-захващащата активност и съдържанието на общи полифеноли ($r^2 = 0.98$) (фиг. А), следвана от съдържанието на антоцианини ($r^2 = 0.96$) (фиг. Б) и общи флавоноиди ($r^2 = 0.92$) (фиг. В).

Обсъждане

Наличието на устойчиви източници на богати на антоцианини продукти с добра стабилност при съхранение би било от огромно значение за качеството на хранителни за хранително-вкусовата промишленост. В това отношение бъзакът би предложил добра

възможност като източник на антоцианинови пигменти, не само поради значителното им съдържание в плодовете, но и поради възможността за лесното им извличане от тях. Това би било добра предпоставка за използването на екстракти от плодовете на бъзак не само като храна, но и като субстрат във за хранителни добавки във фармацевтичната индустрия.

В настоящото изследване е оценен фотохимичния състав на плодове от бъзак, съхранявани при различни условия, с цел установяване на оптималните условия на съхранение, при които биологично активните компоненти остават интактни и функционално активни. Това е важно с оглед използването им под формата на екстракти или тинктури с приложението им в медицината или във фармацията.

Замразените плодове показват значително по-високи стойности на ТП, ТФ и ТМА в сравнение с изсушените. Това се потвърждава и от други автори в изследвания върху плодове от къпина (Contessa et al. 2013; Wang et al. 2011). По отношение на съдържанието на антоцианини в двете групи изследвани плодове излагането на кислорода на въздуха в процеса на сушене, води до бързото разграждане на тези нестабилни съединения (Mitra et al. 2013; Piga et al. 2003; Sadilova et al. 2007). Намалението на концентрацията на ТП, ТФ и ТМА след процеса на изсушаване може да бъде свързано с редица физични и химични промени, включително освобождаване на свързани съединения, частично разграждане на феноли (Larrauri et al. 1997) и бавно инактивиране на окислителни ензими като полифенол оксидази и пероксидази (Garaui et al. 2007). Някои автори съобщават за повишени нива на ТП след изсушаване, което може да се припише на освобождаването на свързани феноли, а също и на хидролиза на сложни такива (Al-Farsi et al. 2005; Chang et al. 2006). И двете изсушени проби показват по-ниско съдържание на ТМА (SE3 - 22.60 ± 0.81 ; SE4 - 13.19 ± 1.99), което е в съответствие с резултатите на López et al. 2010 за екстракти от боровинки.

Тъй като растителните екстракти са сложни системи, които съдържат множество взаимодействащи антиоксиданти, не съществува

единен метод, който да може да оцени точно антиоксидантната им активност. Препоръчително е АОА да бъде оценена поне по два *in vitro* метода (Lutz et al., 2011). Като цяло ТЕ и АЦФ проявяват способност да захващат всички радикали, като ТЕ е по-ефективен от обогатения на антоциани екстракт. Антиоксидантната активност на замразени и пресни плодове от *S.ebulus* се различават статистически ($p < 0.0001$) като по-висока е тази на екстрактите от замразени плодове. Замръзените плодове от м.Шкорпиловци показват най-висока DPPH захващаща активност (58.53%), по-висока от тази на всички други изследвани групи плодове от *S.ebulus*. След изсушаване на плодовете със същия произход DPPH погасяващата им активност намалява с повече от 10 пъти в сравнение с тази на замразения плод (5.01%). При измерване на антиоксидантната активност в процеса на пречистване на ТЕ се установяват незначителни разлики, което е доказателство, че процедурата по пречистването води до отнемане на съединения, които имат принос в антиоксидантната защита, но антоцианините са основно отговорни за това. Получените резултати са в съгласие с проучванията на други автори (Duymus et al., 2014; Neves et al., 2019).

Подобно на зависимостта, оценена чрез ABTS-радикал захващащата активност и при неутрализирането на стабилния DPPH радикал най-силна корелация се установява със съдържанието на ТП, следвано от съдържанието на свободни мономерни антоцианинови пигменти. Положителна корелация между общото фенолно съдържание и антиоксидантната активност е докладвана и от други автори (Thaipong et al., 2006). Това означава, че радикал-захващащата активност на ТЕ и АЦФ може да бъде приписана в голяма степен на съдържанието на антоцианини. В потвърждение на това са и резултатите на други автори за екстракти от плодове на малина и боровинки, установяващи, че антиоксидантният капацитет на анализирания екстракт е свързан в значителна степен със съдържанието на антоцианини в тях. Авторите считат, че на антоцианините може да принадлежи в голяма степен антиоксидантната способност на плодовете (Kallithraka et al., 2005; Matsumoto et al., 2002; Kalt et al., 1999; Wang and Lin, 2000).

Предимство на DPPH анализа в сравнение с ABTS-метода е широката съвместимост на използвания разтворител с водни, полярни и неполярни органични разтворители (Chen, Shen, Su, & Zheng, 2014). Това позволява да бъде оценена антиоксидантната активност на хидрофилни и липофилни антиоксидантни съединения. Друго предимство е, че за провеждане на DPPH анализа, не е необходимо да се добавят вещества, повишаващи разтворимостта като β -циклодекстрин, които са необходими в други анализи.

Високото съдържание на антоцианини в сухите плодове и по-ниската им АОА вероятно се дължи на факта, че в процеса на изсушаване полимерните форми се разпадат, за сметка на мономерните, които са обект на измерване при анализа.

По отношение на температурата на съхранение на замразените плодове Polinati et al. докладват, че съхранението при температура -18°C не води до промяна в антиоксидантната активност в сравнение със съхранението при -70°C . Това обоснова изборът на температура за съхранение - 20°C за замразените плодове. От друга страна, тази температура е постижима за всяко домакинство, с цел използването на плодовете от Бъзак в домашни условия. Разликите в съдържанието на полифеноли в двете замразени проби се дължи най-вероятно на степента на зрялост на плодовете, влажността, почвата и климатичните особености. Това не обяснява обаче разликите в съдържанието на полифеноли при двете изсушени проби, тъй като при тях условията на изсушване са различни. Затова ние си поставихме за задача да оценим антиоксидантната активност на пробите събирани от една и съща местност, по едно и също време и съхранявани при различни условия.

Въз основа на резултатите, получени от измерването на полифенолното съдържание и АОА на екстрактите от четирите изследвани проби плодове на SE, както и на получените пречистени фракции, беше избрана тази, за която са установени най-високо съдържание на фенолни съединения и най-висока антиоксидантна активност. Екстрактът от тази проба впоследствие е изследван за съдържание на полифенолни съединения по разработения от нас LC-PDA-MS метод, оценен е в *in vitro модели* на клетъчни култури

антиоксидантния потенциал и противовъзпалителната активност. Изборът ни се спря на замразените плодове от м. Шкорпиловци, чийто тотален ацетонов екстракт и получената чрез пречистване антоцианинова фракция бяха подложени на *in vitro* изследване за оценяване на биологичната им активност.

В обобщение може да се каже, че данните от изследване на фотохимичния състав и антиоксидантната активност на екстракти от изсушени и замразени плодове на *Sambucus ebulus* и получената от него обогатена на антоцианини фракция проявяват добър антиоксидантен профил. Направеният от нас избор за по-нататъшни изследвания да се използват замразени плодове от м. Шкорпиловци се основава на резултата, показващ най-високо съдържание на полифеноли, флавоноиди и мономерни антоцианинови пигменти и най-висока антиоксидантна активност в общия екстракт и в антоцианиновата фракция. За да оценим по-пълно потенциала на избраните от нас плодове от *Sambucus ebulus* като суровина за фармацевтичната и хранителна промишленост ние проведохме допълнителни изследвания по отношение на тяхната токсичност и биологични ефекти в клетъчни култури.

4. Определяне влиянието на екстракти от *Sambucus ebulus* върху жизнеността на J744A.1 макрофаги

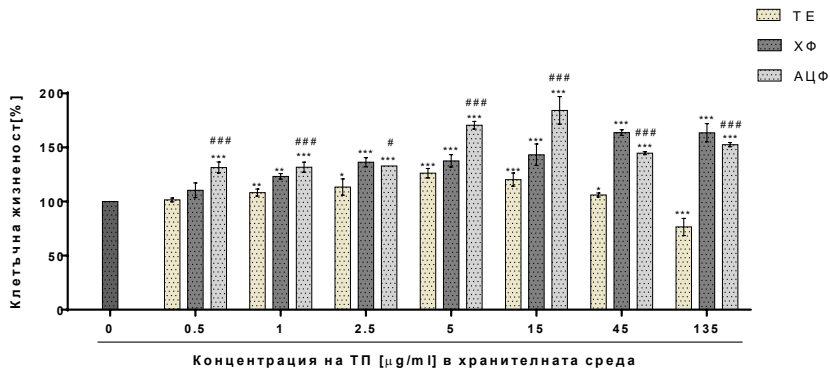
Установяването на пролиферативната и цитопротективна активност на растителните екстракти е важно по отношение на използването им като превантивни и терапевтични средства при състояния, свързани с повишена клетъчна смърт, като възпаление и оксидативен стрес.

За да се проучи действието на получените екстракти от бязак *in vitro* върху макрофажна J774A.1 клетъчна линия, първоначално беше необходимо извършването на предварителен анализ за цитотоксичност на използваните в изследванията екстракти.

Целта на това изследване бе да се установи възможен пролиферативен ефект на билката, както и да бъдат определени подходящи нетоксични концентрации за по-нататъшно прилагане в клетъчните модели. J744A.1 макрофагите бяха третираны в

продължение на 20 часа с DMEM (без фенол ред и добавки), с добавени количества от получените екстракти - ТЕ, ХФ и АЦФ, така че да се получат крайни точни концентрации на ТП в средата за третиране, както следва: 0.5; 1; 2,5; 5; 15; 45; 135 $\mu\text{g/mL}$. Концентрацията на ТП в изходните екстракти беше определена спектрофотометрично по метода на Folin-Ciocalteu, както е описано в раздел V, точка 2.1. Оптимизиране и валидиране на метода за определяне на концентрацията на общи полифеноли. Резултатите от извършения МТТ тест са представени на Фигура 8.

При нарастване на концентрациите на екстракта в диапазона от 0,5 $\mu\text{g/mL}$ до 135 $\mu\text{g/mL}$ се наблюдава значимо изменение в жизнеността на клетките спрямо контролната група нетретирани макрофаги. Изследванията показват, че жизнеността на клетките, третирани с ТЕ, ХФ и АЦФ от плодове на *Sambucus ebulus* се увеличава с повишаване на концентрацията на ТП в хранителната среда и при трите вида екстракт, като максималната отчетена стойност е 184% ($p < 0,001$) при АЦФ. В изследвания концентрационен диапазон за ТП цитотоксичен ефект се наблюдава единствено при групата макрофаги третирана с тотален екстракт с концентрация на полифенолите 135 $\mu\text{g/mL}$, като клетъчната жизненост се понижава с 24% ($p < 0,001$) спрямо нетретираната контролна група. При ХФ се наблюдава плавно увеличение в клетъчната жизненост, която достига максимална стойност от 164% ($p < 0,001$). При клетките, третирани с ТЕ и АЦФ беше установено първоначално плавно увеличение на клетъчната жизненост, която достига максимална стойност от 126% ($p < 0,001$) при концентрация 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП за ТЕ и 184% ($p < 0,001$) при 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП за АЦФ. При по-високите приложени концентрации клетъчната жизненост започва плавно да се понижава за двата екстракта, като при АЦФ стойностите остават статистически значимо по-високи от нетретираната контрола. За ТЕ при концентрации 15 и 45 $\mu\text{g/mL}$ клетъчната жизненост също остава значително по-висока в сравнение с нетретираната контрола. От всички изследвани концентрации за съответните екстракти единствено 135 $\mu\text{g/mL}$ ТЕ имаше токсичен ефект – 24% ($p < 0,001$) върху клетъчна жизненост спрямо нетретираната контрола.



Фигура 8. Резултати от анализа на цитотоксичност на различни концентрации на тоталния екстракт и получените фракции от *Sambucus ebulus* L. при J774A.1 макрофажна клетъчна линия. Клетъчната жизнениост е изчислена като процент от жизнениостта на нетретираната контрола [0 µg/mL]. Представени са средните стойности за всяка една група ± SD

*p<0,05 спрямо 0 µg/mL; **p<0,01 спрямо 0 µg/mL; ***p<0,001 спрямо 0 µg/mL; #p,0,05 спрямо ТЕ; ###p<0,001 спрямо ТЕ

Направеното сравнение между жизнениостта на макрофагите, третираны с АЦФ и тези, третираны със същите концентрации от ТЕ беше установено сигнификантно повишение на клетъчната жизнениост при клетките, третираны с АЦФ във всички приложени концентрации в диапазона от 20 % до 76%. Значимо по-висока клетъчна жизнениост във всички приложени концентрации беше установена при сравнение между клетките, третираны с ХФ, спрямо тези, третираны с ТЕ. Сигнификантни бяха установените разлики в клетъчната жизнениост и при сравнение между ХФ и АЦФ.

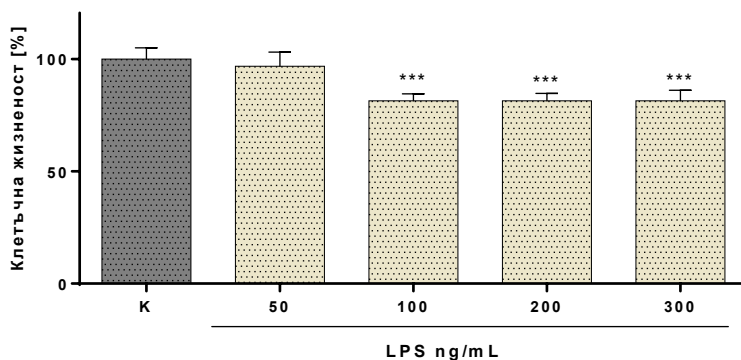
Въз основа на получените резултати от проведения МТТ тест за нуждите на следващите експерименти и за установяване на цитопротективен ефект на екстрактите от плодове на *Sambucus ebulus* в условия на LPS провокирана антиоксидантна защита и индуциран

възпалителен отговор бяха избрани концентрации със съдържание на ПФ в тях от 5, 15, 45, 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Подборът беше мотивиран от получените резултати, така, че да бъдат избрани концентрации, които да проявяват както слабо токсичен, така и ясно изразен пролиферативен ефект върху третираните клетки, както и да има еднаква разлика между нарастващите концентрации.

5. Изследване влиянието на екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* върху J774A.1 макрофажна клетъчна линия в модел на LPS индуцирана цитотоксичност.

Определяне влиянието на LPS върху жизнеността на J774A.1 макрофажна клетъчна линия

Поставените в настоящата работа задачи предвиждаха провеждане на експерименти с бактериален LPS, с цел индуциране на възпалителен отговор. Поради тази причина беше необходимо да се определи влиянието им върху жизнеността на използваните в експериментите клетки. Проведен беше МТТ тест за цитотоксичност на LPS върху J774A.1 макрофажна клетъчна линия. Резултатите от анализа са представени на фигура 9.



Фигура 9. Влияние на различни концентрации на LPS от *E. coli* (026:B6) върху жизнеността на J774A.1 макрофажна клетъчна линия. Клетъчната жизненост е изчислена като процент от жизнеността на нетретираната контрола [0 ng/mL].

*** $p < 0,001$ спрямо K (0 ng/mL)

Ние тествахме различни концентрации на LPS (50 - 300 ng/mL) по отношение на тяхното въздействие върху клетъчната жизненост на J744A.1 клетъчна линия. Целта беше за нуждите на следващите експерименти да се установи концентрация, допринасяща за значима клетъчна смърт. Резултатите показаха, че най-ниската приложена концентрация (50 ng/mL), има незначителен, цитотоксичен ефект в клетъчната култура J744A.1, което води до около 4% клетъчна смърт. Следващите три приложени концентрации (100, 200 и 300 ng/mL) показаха еднакъв,+ статистически значим токсичен ефект, водещ до почти 20% клетъчна смърт ($p < 0,001$), спрямо нетретирана контролна група клетки.

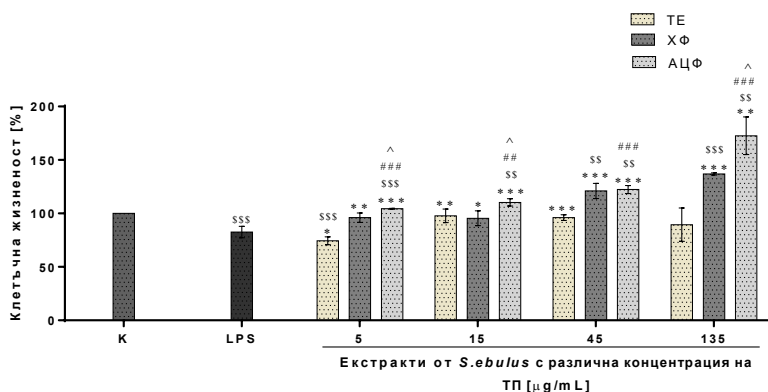
За нуждите на планираните експерименти, за установяване на възможния цитопротективен ефект на екстракта от плодове на *Sambucus ebulus* и получените от него фракции в условия на LPS третиране ние избрахме концентрация от 100 ng/mL, поради изразеният цитотоксичен ефект, който съвпада със същия на следващите по-високи концентрации. Такава концентрация за третиране се посочва в голяма част от прочетената литература.

Изследване на протективното действие на екстракти от плодове на Sambucus ebulus върху J774A.1 макрофажна клетъчна линия в модел на LPS индуцирана цитотоксичност.

Анализът на протективното действие на ТЕ и получените от него пречистени фракции върху J774A.1 макрофаги в условия на индуцирана клетъчна смърт бе осъществен чрез 24 часово претретиране на клетките с избрани нарастващи концентрации (5, 15, 45, 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП) на екстрактите от *S. ebulus* и последващо третиране със 100 ng/mL LPS, за която беше установено, че води до намаляване на клетъчна жизненост с 20%, спрямо нетретирана контролна група клетки. Резултатите от проведения МТТ тест са представени като процент от жизнеността на нетретираната група (0 $\mu\text{g/mL}$ ТП). За оценка на протективното действие, жизнеността беше изчислена като процент от жизнеността на контролната група клетки (0 ng/mL LPS).

Претретирането на клетките с избраните концентрации от изследваните екстракти доведе до установяване на значително по-висока клетъчна жизненост в сравнение с клетките, третирани с LPS, с изключение на 135 µg/mL ТЕ.

Единствено в групата, третирана с 5 µg/mL ТЕ, беше установена по-ниска клетъчна жизненост в сравнение с LPS групата. За концентрации от 15, 45 и 135 µg/mL за ТЕ и 5 и 15 µg/mL за ХФ, установената жизненост на претретираните клетки не се различава от тази на нетретираната контрола, което отново показва подобрена клетъчна жизненост. Всички концентрации на АЦФ, както и концентрации от 45 и 135 µg/mL на ХФ, приложени като претретиране, доведоха до установяване на статистически значима по-висока жизненост в сравнение и с нетретираната контрола.



Фигура 10. Влияние на екстракти от *S. ebulus* върху жизнеността на J774A.1 в модел на LPS индуцирана цитотоксичност. Клетъчната жизненост е изчислена като процент от жизнеността на нетретираната контрола [0 µg/mL]. Представени са средните стойности за всяка една група ± SD.

*p<0,05 спрямо LPS; **p<0,01 спрямо LPS; ***p<0,001 спрямо LPS; \$\$\$p<0,01 спрямо К; \$\$\$p<0,001 спрямо К; ##p<0,01 спрямо ТЕ; ###p<0,001 спрямо ТЕ; ^p<0,05 спрямо ХФ.

Сравнението между ефекта на жизнеността на еднакви концентрации на различни екстракти показва статистически значима разлика между ТЕ и АЦФ за всички приложени като претретиране концентрации на ТП (30% ($p<0,001$) за 5 $\mu\text{g/mL}$; 12% ($p<0,01$) за 15 $\mu\text{g/mL}$; 26% ($p<0,001$) за 45 $\mu\text{g/mL}$ и 84% ($p<0,001$) за 135 $\mu\text{g/mL}$) в полза на АЦФ. Статистическа значимост беше установена и при сравняване на три от концентрациите, използвани за претретиране от ХФ и АЦФ (8% ($p<0,05$) за 5 $\mu\text{g/mL}$; 15% ($p<0,05$) за 15 $\mu\text{g/mL}$ и 35% ($p<0,05$) за 135 $\mu\text{g/mL}$) в полза на АЦФ.

За оценка на протективното действие на екстрактите беше изчислена степента на подобряване на клетъчната жизненост от екстрактите, използвани за претретиране в модела на LPS индуцирана цитотоксичност. За тази цел клетъчната жизненост беше изчислена като процент от жизнеността на клетките, третиран с LPS (Таблица 8).

Таблица 8. Процент подобрена клетъчна жизненост на претретирани с екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* J744A.1 макрофаги в модел на LPS индуцирана цитотоксичност. Клетъчната жизненост е изчислена като процент от жизнеността на третираната с LPS контрола [100 ng/mL].

Вид екстракт	Тотален екстракт		Хидрофилна фракция		Антоцианинова фракция	
	Клетъчна жизненост т [%]	p value спрямо LPS	Клетъчна жизненост т [%]	p value спрямо LPS	Клетъчна жизненост т [%]	p value спрямо LPS
5	↓	0,05	13	0,01	21	0,001
15	16	0,01	13	0,05	27	0,001
45	13	0,001	38	0,001	39	0,001
135	↓	-	54	0,001	90	0,01

Най-изявен цитопротективен ефект беше установен при АЦФ, която значително подобри клетъчната жизненост във всички приложени концентрации, съответно със 21, 27, 39, 97% ($p < 0,001$). По-нисък, но значим е ефектът на ХФ, където максималното подобряване на клетъчната жизненост достигна 165% ($p < 0,001$) при концентрация на ТП от 135 $\mu\text{g/mL}$. Единствено при ТЕ, приложен в концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ беше отчетено значимо по-ниска клетъчната жизненост ($p < 0,05$) спрямо LPS. Максимално подобряване на жизнеността за ТЕ е 118% за концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$).

Обсъждане

Изборът на експериментален модел за изследване на протективното действие на екстракти от *Sambucus ebulus* в модел на индуцирана цитотоксичност бе мотивиран от факта, че възпалението е обединяващото звено между редица патологични състояния. В тази връзка логично е търсенето на биологично активни вещества, които да повлияват в благоприятна посока процеса на възпаление, което да понижи вероятността от развитие на усложнения.

Влияние на изследваните екстракти от Sambucus ebulus върху жизнеността на J744A.1 макрофажна клетъчна линия.

Растителните екстракти са широко проучени във връзка с техните защитни ефекти в различни модели, включително модели на оксидативен стрес и индуцирано възпаление. Установяването на цитопротективният ефект на растителните екстракти е важен във връзка с използването им като превантивни и терапевтични средства при състояния, свързани с повишена клетъчна смърт, като възпаление и оксидативен стрес.

В нашето проучване първоначално изследвахме ефекта на различни концентрации от екстракта и получените от него фракции върху клетъчната жизненост, за да установим подходящи такива за нуждите на последващите експерименти в модел LPS индуцирана клетъчна смърт, възпаление и оксидативен стрес. При провеждане на МТТ тест с цел установяване на нетоксични концентрации, някои

автори докладват за пролиферативен ефект на изследваните растителни екстракти.

В настоящото изследване беше установено, че всички изследвани екстракти в приложените концентрации (0,5 – 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП) имат пролиферативен ефект. Единствено при групата макрофаги третирана с ТЕ с концентрация на ТП 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ клетъчната жизненост се понижава с 24% ($p < 0,001$) спрямо нетретирания контролна група. Изследванията показват, че жизнеността на клетките, третирани с екстракта и фракциите от плодове на *Sambucus ebulus* се увеличава с повишаване на концентрацията на ТП в хранителната среда и при трите вида екстракт, като максималната установена стойност е за АЦФ при 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП - 85% ($p < 0,001$).

При хидрофилната фракция се наблюдава плавно увеличение в клетъчната жизненост, спрямо контролната група, която достига максимална стойност от 64% ($p < 0,001$) при концентрация от 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП. При ТЕ беше установено първоначално плавно увеличение на клетъчната жизненост, която достига максимална стойност от 26% ($p < 0,001$) по-висока от тази на нетретирания контрола. Максимална пролиферация, за групите макрофаги, третирани с АЦФ беше установена при концентрация от 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП с 84% ($p < 0,001$) спрямо контролата. При по-високите приложени концентрации клетъчната жизненост започва плавно да се понижава за ТЕ и АЦФ, като при АЦФ стойностите остават статистически значимо по-високи от нетретирания контрола.

Получените в настоящото изследване резултати са в съответствие с предходни изследвания на колектива, а също и на други автори. В експерименти с друго лечебно растение - *Agrimonia eupatoria*, стимулиране на клетъчната пролиферация при ниски концентрации на растителния екстракт също е установено в 3Т3-L1 преадипоцитна клетъчна линия (Ivanova et al. 2013).

Въпреки, че не е съобщена като значима, е установена повишена клетъчна жизненост (около 20%) в миши фибробластни L929 клетки, третирани с антоцианини и антоцианидини (Wang et al. 2017).

Пролиферативният ефект на екстрактите би могъл да се обясни със способността на някои полифенолни съединения да активират MAP сигналните каскади (Kong et al. 2000).

За много от изследваните растителни екстракти в литературата се споменава за цитотоксичен ефекти. Цитотоксичното действие на екстрактите се обяснява със способността на полифенолите да инхибират клетъчното делене и да индуцират апоптоза. Тези изследвания са проведени предимно върху туморни клетки, с цел установяване на тяхното противораково действие. Dzhambazov et al. (2002) установяват цитотоксично действие на екстракт от *Clinopodium vulgare* върху A2058 (human metastatic melanoma), HEP-2 (epidermoid carcinoma, larynx, human) и L5178Y (mouse lymphoma) клетки. За кверцетин е установено, че може да индуцира апоптоза в 3T3-L1 адипоцити като понижава степента на фосфорилиране на ERK и JNK, като модулира сигналните пътища, медиирани от тях (Ahn et al., 2008). Кверцетин също така стимулира апоптозата като понижава митохондриалния мембранен потенциал и активира Bax и Bak протеините и инхибира Bcl-2 (Hsu et al., 2008).

Понижената жизнестойност на клетките в някои от изследваните концентрации на екстрактите може да се обясни с проявата на токсични ефекти на някои от компонентите на екстракта, когато се прилагат във високи концентрации. Дали екстрактите ще проявят цитотоксичен или пролиферативен ефект ще зависи от прилаганите концентрации, времето за третиране, както и от типа клетки.

Влияние на LPS върху жизнестойността на макрофажна клетъчна линия

За изследване на протективното действие на екстракт от плодове на *S.ebulus* в модел на LPS индуцирана клетъчна смърт, първо определихме концентрация на LPS, необходима за третиране на макрофагите. LPS е компонент на клетъчна стена на грам-отрицателни бактерии и действа като ендотоксин. LPS играе важна роля за структурната цялост на бактериите и защитата на бактериалните мембрани от определени видове химическа атака. Може да предизвика

остър възпалителен отговор, като задейства освобождаването на голям брой възпалителни цитокини в различни клетъчни типове. LPS е мощен активатор на моноцити, макрофаги и други видове клетки и се използва за изследване на възпалението, поради изобилието на възпалителни фактори, които той индуцира. Индуцира имуен отговор чрез свързване с Toll-Like рецептор 4 (TLR4) в различни имунни клетки, включително моноцити, дендритни клетки, макрофаги и В клетки (Janssens et al., 2003).

В настоящото изследване тествахме различните концентрации на LPS (50 - 300 ng/mL) по отношение на тяхното въздействие върху клетъчната жизнестойност на J744A.1 макрофаги. Целта беше установяване на концентрацията, допринасяща за значима клетъчна смърт за нуждите на следващите експерименти. Анализът на резултатите от проведения МТТ тест показаха статистически значимо ($p < 0,001$) понижение на клетъчната жизнестойност с приблизително 20% за концентрации от 100, 200 и 300 ng/mL (фиг.18.). Резултатите показват, че най-ниската приложена концентрация (50 ng/mL), има незначителен, цитотоксичен ефект в клетъчната култура J744A.1, което води до около 4% клетъчна смърт.

В този експеримент токсичният ефект на LPS се потвърждава в съгласие с други проучвания в различни модели на клетъчни култури, където LPS се използва като ефективен индуктор на възпалителен отговор. В такива експерименти е доказано, че LPS предизвиква клетъчна смърт при високи концентрации. Степента на преживяемост на клетките при определените концентрации зависи от типа клетки, както и от времето на експозиция (Stone et al., 2003).

Протективно действие на екстрактите от Sambucus ebulus в модел на LPS индуцирана цитотоксичност

Като задача в настоящото изследване, трябва да се установи дали изследвания ТЕ, ХФ и АЦФ притежават потенциал да защитят клетките при LPS индуцирана клетъчна смърт.

Протективното действие на ТЕ, ХФ и АЦФ беше анализирано върху J774А.1 макрофажна клетъчна линия, в условия на индуцирано с LPS цитотоксичност.

За да се оцени ефекта на екстрактите върху подобряването на клетъчната жизнестойност в този модел, клетките първо бяха инкубирани с избраните концентрации от екстрактите (5, 15, 45, 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП) в продължение на 24 часа (претретиране), след което към тях беше добавена нова хранителна среда, която съдържа LPS в избраната концентрация (100 ng/mL), за която беше установено, че предизвиква статистически значима цитотоксичност (20%). Жизнестойността на претретираниите клетки беше изчислена като процент от жизнестойността на нетретираниите групи (0 $\mu\text{g/mL}$ ТП и 0 ng/mL LPS).

Резултатите от нашето проучване показаха, претретирането на клетките с избраните концентрации от изследваните екстракти води до установяване на значително по-висока клетъчна жизнестойност в сравнение с клетките, третирани с LPS, с изключение на 135 $\mu\text{g/mL}$ ТЕ (фиг. 18). Единствено в групата, третирана с 5 $\mu\text{g/mL}$ ТЕ, беше установена по-ниска клетъчна жизнестойност в сравнение с LPS групата. За концентрации от 15, 45 и 135 $\mu\text{g/mL}$ за ТЕ и 5 и 15 $\mu\text{g/mL}$ за ХФ, установената жизнестойност на претретираниите клетки не се различава от тази на нетретираниите контроли, показвайки подобрена клетъчна жизнестойност. Всички концентрации на АЦФ и 45 и 135 $\mu\text{g/mL}$ на ХФ, приложени като претретиране, доведоха до установяване на статистически значимо по-висока жизнестойност в сравнение и с нетретираниите контроли, което протективният потенциал на екстрактите от *Sambucus ebulus*.

С цел да се анализира по какъв начин и дали фракционирането и получаването на ХФ и АЦФ е свързано с промяна в биологичната активност беше направено сравнение между еднакви концентрации на различни екстракти. Резултатите показаха статистически значима разлика между ТЕ и АЦФ за всички приложени като претретиране концентрации на ТП (30% ($p < 0,001$) за 5 $\mu\text{g/mL}$; 12% ($p < 0,01$) за 15 $\mu\text{g/mL}$; 26% ($p < 0,001$) за 45 $\mu\text{g/mL}$ и 84% ($p < 0,001$) за 135 $\mu\text{g/mL}$). Статистическа значимост беше установена и при сравняване на три от концентрациите, използвани за претретиране от ХФ и АЦФ (8%

($p < 0,05$) за 5 $\mu\text{g/mL}$; 15% ($p < 0,05$) за 15 $\mu\text{g/mL}$ и 35% ($p < 0,05$) за 135 $\mu\text{g/mL}$). На базата на получените резултати можем да заключим, че пречистването на екстракта от плодове на *S. ebulus* води до повишаване на клетъчната жизненост и до установяване на по-силен цитопротективен ефект в модел на LPS индуцирана цитотоксичност.

Беше изчислен ефектът на подобряване на клетъчната жизненост от екстрактите, използвани за претретиране в модела на LPS индуцирана цитотоксичност. За тази цел клетъчната жизненост беше изчислена като процент от жизнеността на клетките, третирани с LPS.

Най-изявен цитопротективен ефект беше установен при АЦФ, която значително подобри клетъчната жизненост във всичко приложени концентрации, съответно със 126, 133, 148, 208% ($p < 0,001$ за всички приложени концентрации). По-нисък, но статистически значим е ефекта на ХФ, където максималното подобряване на клетъчната жизненост достигна 165% ($p < 0,001$) при концентрация на ТП от 135 $\mu\text{g/mL}$. Единствено при ТЕ, приложен в концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ беше отчетено значимо по-ниска клетъчната жизненост ($p < 0,05$). Максимално подобряване на жизнеността за ТЕ е 118% за концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$).

Макрофагите играят ключова роля при възпалителните отговори, произвеждайки различни възпалителни медиатори, такива като азотна оксид (NO) и простагландин E2 (PGE2) и чрез продуциране про-възпалителни цитокини, включително TNF α , IL-1 β и IL-6 и други (Fujiwara N et al. 2005). LPS -стимулирани макрофаги се използват широко като модел за оценка на силата на противовъзпалителните средства и проучване на техния механизъм на действие, тъй като LPS е мощен индуктор на възпалителен отговор.

Въпреки, че този модел е широко използван за изследване на протективното действие на различни субстанции и екстракти по отношение на различни процеси, като възпаление, оксидативен стрес и др., данни за установено протективно действие в модел на индуцирана цитотоксичност липсват. По наши данни това е първото такова изследване. Нашите данни показват потенциала на екстрактите от

S.ebulus да предотвратяват клетъчна смърт в условия на LPS индуциране в клетъчна култура. В допълнение резултатите показват не само подобрена, но дори и по-висока клетъчна жизнестойкост спрямо LPS групата за някои от приложените концентрации на ТП в хранителната среда.

Предварителното третиране на клетките с нарастващи концентрации от екстракта и антоцианиновата фракция, преди прилагането на възпалителен стимул намалява цитотоксичността, индуцирана от LPS. Богатият на антоцианини екстракт напълно елиминира индуцираната от LPS цитотоксичност, както се вижда от промените в жизнестойкостта на клетките. Богатият на антоцианини екстракт показва цитопротективен ефект срещу LPS индуцирано възпаление.

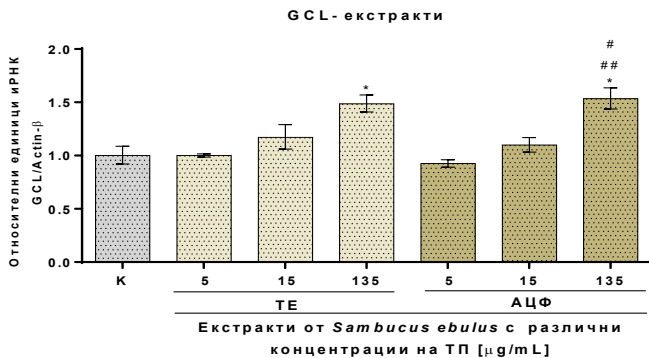
Цитопротективното действие АЦФ и в по-малка степен на ТЕ може да се дължи на свойствата на биологично активни компоненти в плодовете на *Sambucus ebulus*, а именно обратимо редоксповедение и антиоксидантна активност. Биологично активните съединения в растителните екстракти също така могат да осигуряват индиректна защита срещу оксидативен стрес, чрез активиране на сигнални каскади, които подобряват работата на ендогенните антиоксидантни системи на клетката (Uradhuay & Dixit, 2015). Тези ефекти на полифенолите ние изследвахме на следващия етап от нашето изследване, където анализирахме експресията на антиоксидантните ензими GCL, GS, GPx и GR, както и тяхното съгласувано действие при регулиране на съотношението GSSG/GSH, което определя вътреклетъчното редокссъстояние на клетките (Jones, 2010).

6. Изследване влиянието на тотален екстракт и антоцианинова фракция от плодове на *Sambucus ebulus* J774A.1 макрофаги върху експресията на гени, свързани с антиоксидантната защита в условия на третиране с LPS

Влияние върху експресията на γ -глутаматцистеин лигаза (GCLc)

Влияние върху транскрипционните нива на GCLc в нестимулирани J774A.1 макрофаги

γ -глутаматцистеин лигаза (GCL) - е скоростоопределящият ензим от *de novo* синтеза на GSH. В нашето изследване анализирахме експресията на GCLc – каталитичната субединица.



Фигура 11. Влияние на екстракти от *Sambucus ebulus* върху експресията на GCLc в нестимулирани J774A.1 макрофаги, третирани с нарастващи концентрации от ТЕ и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група нетретирани клетки.

* $p < 0,05$ спрямо К; ** $p < 0,001$ спрямо К; # $p < 0,05$ спрямо конц. 15 µg/mL; ## $p < 0,01$ спрямо конц. 5 µg/mL.

При третиране на нестимулирани J774A.1 макрофаги с ТЕ и АЦФ в избрани, нарастващи концентрации на ТП - 5, 15, 135 µg/mL в продължение на 24 часа беше отчетен стимулиращ ефект и на двата екстракта върху експресията на гена за GCLc (фиг. 11). При ниските концентрации, със съдържание на ТП от 5 µg/mL не беше отчетено стимулиране на нивата на антиоксидантния ензим и при двете фракции. Статистически значимо увеличение на експресията на GCLc беше отчетена при най-високите концентрации (135 µg/mL), като АЦФ повишава в най-голяма степен експресията, с 53% ($p < 0,05$), а за ТЕ това повишение е 48% ($p < 0,05$). Значителна разлика беше установена при сравнение на експресията на ензима между клетките третирани с концентрация от 5 µg/mL и тези, третирани с концентрация от 135 µg/mL от АЦФ ($p < 0,01$), както и при сравнение между концентрация от 15 µg/mL и концентрация от 135 µg/mL от АЦФ ($p < 0,05$).

Направено беше сравнение между експресията на GCLc при клетки, третирани с еднакви концентрации двата екстракта. Разликите в експресията са изразени в проценти и са представени в таблица 9. Не бяха отчетени значими разлики в експресията на GCLc между групите третирани с еднакви концентрации на ТП от двата приложени екстракта.

Таблица 9. Сравнение в генната експресия на GCLc в J774A.1 макрофаги третирани с ТЕ и АЦФ с еднакви концентрации на ПФ.

	Концентрация на ТП [µg/mL]		
	5	15	135
Разлика в експресията на GCL [%]	↓ 7%	↓ 17%	↑ 4%
p value	ns	ns	ns

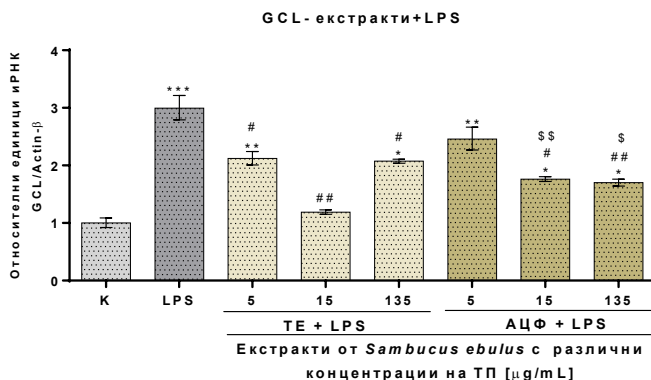
(↑ - показва по-висока експресия в АЦФ; ↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ)

Влияние върху транскрипционните нива на GCL в J774A.1 макрофаги в условия на LPS индуциран възпалителен отговор

За да изследваме ефекта на ТЕ и АЦФ от плодове на *Sambucus ebulus*, в условия на LPS стимулирани J774A.1 макрофаги, първоначално клетките бяха претретирани за 24 часа с избраните концентрации от изследваните екстракти. След това бяха третирани със 100 ng/mL LPS (за 20 часа) за индукция на възпалителен отговор. Претретерирането на J774A.1 макрофаги, предшествашо LPS индуцирането, доведе до установяване на понижени стойности на експресията на GCLc в тези клетки в сравнение с клетките, третирани само с LPS (фиг. 12).

При контролните групи клетки, третирани с индуктора на възпаление – LPS експресията на ензима е статистически значима, като се повишава с 200% спрямо нетретерираната контрола ($p < 0,001$). При клетките претретирани с ТЕ най-силно проявен ефект на билката беше установен при концентрация от 15 µg/mL, като стойността се доближава до експресията на нетретерираната, контролната група клетки. При останалите две концентрации от ТЕ 5 и 135 µg/mL генната експресия все още е по-висока със 112% ($p < 0,01$) и 108% ($p < 0,05$) спрямо нетретерираната контролна група клетки.

При клетките, претретиран с АЦФ експресията на ензима беше по-висока значимо със 146% ($p < 0,05$) при групата претретирана с концентрация на 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП спрямо нетретираната контрола. В следващите две концентрации беше отчетена значително по-ниска от LPS групата, но значимо по-висока експресия в сравнение с нетретираната контрола, съответно за концентрация 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП, повишението е със 76% ($p < 0,05$) и за концентрация 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП – 70% ($p < 0,05$) спрямо контролната група.



Фигура 12. Влияние на екстракт от *Sambucus ebulus* върху експресията на GCL в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги, претретиран с нарастващи концентрации от ТЕ и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група нетретираните клетки.

* $p < 0,05$ спрямо К; ** $p < 0,01$ спрямо К; # $p < 0,05$ спрямо LPS; ## $p < 0,01$ спрямо LPS; \$ $p < 0,05$ спрямо 135 $\mu\text{g/mL}$ ТЕ; ## $p < 0,01$ спрямо 15 $\mu\text{g/mL}$.

Сравнението между различните приложени концентрации от ТЕ установи несигнификатна разлика между концентрациите от 5 и 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП и концентрацията от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП. При нея ефектът на билката се проявява най-силно, понижавайки експресията на ензима с повече от 90% спрямо останалите две концентрации. В групите, претретиран с различни концентрации от АЦФ, ниската концентрация на екстракта (5 $\mu\text{g/mL}$ ТП) проявява по-слаб понижаващ спрямо LPS групата ефект в сравнение с останалите две концентрации (15 и 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП), които понижават експресията със 75% повече.

При сравняване на ефекта на еднакви концентрации от двата вида екстракт беше установена статистическа значима разлика в експресията при макрофагите, претретиран с концентрация 15 µg/mL ТП, където при ТЕ беше отчетена експресия с 57% (p<0,001) по-ниска от тази, отчетена при групата клетки, претретирана с АЦФ. При най-високата концентрация 135 µg/mL ТП понижението на експресията беше по-голямо при АЦФ – с 37% (p<0,05)

Таблица 9. Сравнение в генната експресия на GCLc в J774A.1 макрофаги претретиран с ТЕ и АЦФ с еднакви концентрации на ПФ.

	Концентрация на ТП [µg/mL]		
	5	15	135
Разлика в експресията на GCLc [%]	↑ 34%	↑ 57%	↓ 37%
p value	ns	0,001	0,01

(↑ - показва по-висока експресия в АЦФ; ↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ)

За да се установи в каква степен претретирането с ТЕ и АЦФ понижава ефекта на LPS, експресионните нива на GCLc в претретираните групи беше изчислен като процент спрямо тези на LPS групата, която е приравнена на 100%. Резултатите са представени в таблица 10.

Таблица 10. Разлики в генната експресия на GCLc в проценти между претретиран с екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* J774A.1 макрофаги и такива, третиран с LPS.

Вид екстракт	ТЕ		АЦФ	
	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS
5	↓ 30%	p<0,05	↓ 18%	ns
15	↓60%	p<0,01	↓ 41%	p<0,01
135	↓ 31%	p<0,05	↓43%	p<0,01

(↓ - показва по-ниска експресия в сравнение с експресията в LPS групата)

При клетките претретираните с ТЕ най-силно понижение на експресията на GCLc с 60% ($p < 0,01$) беше отчетено при концентрация от 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, докато при останалите две концентрации понижение беше двукратно по-малко, но значимо ($p < 0,01$). При претретираните с АЦФ клетки беше установено плавно понижение на експресията на GCLc, като най-ниска стойност на експресията беше достигната при концентрация 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$, понижено с 43% ($p < 0,01$).

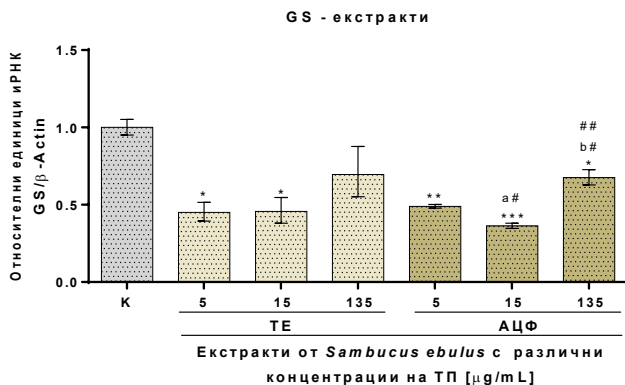
Влияние върху експресията на глутатион синтетаза (GS)

Експресия на GS в нестимулирани J774A.1 макрофаги

Резултатите представени на фигура 21 показват нивата на генна експресия на ензима GS в клетки, третираните с ТЕ и АЦФ, както и контролните групи нетретираните клетки. Експресията на протеина при групите третираните в различни концентрации от ТЕ беше понижена с 55% ($p < 0,05$) в двете концентрации от 5 и 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП ($p < 0,05$). Несигнификантно понижение беше установено при високата концентрация от ТЕ 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП, както и несигнификантна разлика в ефекта между нея и останалите две концентрации (5 и 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ПФ) от ТЕ.

При АЦФ максимално понижението на генната експресия с 64% ($p < 0,001$) беше отчетено при концентрация от 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП спрямо нетретираната контролна група. Статистическо значимо понижение на експресията се наблюдаваше и в групата клетки, третираните с АЦФ в концентрация от 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП – 50% ($p < 0,01$), спрямо нетретираната контролна група клетки. Най-слабо понижение на експресията, но значимо се установи при групата третирана с АЦФ в концентрация от 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП, с 33% ($p < 0,05$) спрямо контролата.

Сравнението в експресията на ензима в групите, третираните с различни концентрации от АЦФ установи еднакво значими разлики между ниската концентрация от 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП и останалите две концентрации от 15 и 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП ($p < 0,05$). По-висока значимост беше установена в разликата в ефекта между концентрации от 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ПФ и 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП ($p < 0,01$).



Фигура 13. Влияние на екстракт от *Sambucus ebulus* върху експресията на GS в нестимулирани J774A.1 макрофаги, третирани с нарастващи концентрации ТЕ и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група нетретирани клетки.

* $p < 0,05$ спрямо K; ** $p < 0,01$ спрямо K; *** $p < 0,001$ спрямо K; a# $p < 0,05$ спрямо АЦФ 5; b# $p < 0,05$ спрямо АЦФ 5; ## $p < 0,01$ спрямо АЦФ 15.

С цел да се установи влиянието на фракционирането върху ефекта на екстракта беше направено сравнение между експресията на GS при клетки, третирани с еднакви концентрации на двата вида екстракт. Разликите в експресията са изразени в проценти и са представени в таблица 11. Не бяха отчетени значими стойности на разликите в експресията при двата приложени екстракта.

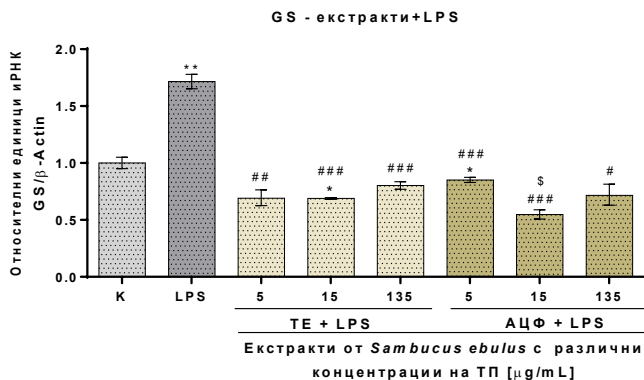
Таблица 11. Сравнение в генната експресия на GS в J774A.1 макрофаги, третирани с еднакви концентрации от ТЕ и АЦФ.

	Концентрация на ТП [µg/mL]		
	5	15	135
Разлика в експресията на GS [%]	↑ 4%	↓ 10%	↓ 2%
p value	ns	ns	ns

(↑ - показва по-висока експресия в АЦФ; ↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ)

Влияние върху транскрипционните нива на GS в J774A.1 макрофаги в условия на LPS индуциран възпалителен отговор

В модела на LPS-индуциран възпалителен отговор на J774A.1 макрофаги, генната експресия на GS беше значително повишена в групата третирана с LPS със 71% ($p < 0,001$) в сравнение с нетретираната контролна група клетки. Във всички групи претретираните с избраните концентрации от ТЕ и АЦФ нивата на генна експресия на ензима бяха значимо понижени, в сравнение с LPS стимулираните клетки, като нивата на експресия бяха по-ниски и от тези на нетретираната контролна група. При групите макрофаги, претретираните с концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ПФ от ТЕ експресията показва нива сигнификантно по-ниски от това на нетретираната контрола с 30% ($p < 0,05$). Същата значимост беше установена и при групата, претретирана с концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП от АЦФ, където понижението на експресията беше с 15% ($p < 0,05$), спрямо нетретираната контрола.



Фигура 13. Влияние на екстракт от *Sambucus ebulus* върху експресията на GS в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги претретираните с нарастващи концентрации от ТЕ и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група нетретираните клетки.

* $p < 0,05$ спрямо К; ** $p < 0,005$ спрямо К; # $p < 0,05$ спрямо LPS; ## $p < 0,005$ спрямо LPS; ### $p < 0,001$ спрямо LPS; § $p < 0,05$ спрямо АЦФ+LPS 5.

Най-силно инхибиране на ефекта на LPS върху експресията на GS в групите клетки, претретиран с TE беше наблюдавано при концентрации от 5 и 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП, където понижението достига 102% ($p < 0,001$), сравнено с експресията на групата третирана с LPS. В по-нисък процент 91%, със същата значимост ($p < 0,001$) бе инхибирана експресията и при високата концентрация от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП на същия екстракт. И трите приложени концентрации от TE понижават експресията на белтъка спрямо нетретираната контрола, като значимост беше установена при концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП ($p < 0,05$). Не бяха установени значими разлики при сравнение между нивата на гена експресия в групите, третиран с различни концентрации от TE.

Най-силно понижение на експресията на гена, сравнено с експресията в групата, третираната с LPS, се наблюдаваше в групата макрофаги, претретиран с концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП от АЦФ - 116% ($p < 0,001$). Останалите две концентрации (5 и 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП) от АЦФ понижиха значимо ($p < 0,001$; $p < 0,05$), но в по-ниска степен експресията на GS. При сравняване на ефекта на различните концентрации от АЦФ върху експресията на GS беше установена значима разлика между концентрации от 5 $\mu\text{g/mL}$ ПФ и 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП с 30% ($p < 0,05$).

Таблица 11. Сравнение в генната експресия на GS в J774A.1 макрофаги претретиран с TE и АЦФ с еднакви концентрации на ТП.

	Концентрация на ТП [$\mu\text{g/mL}$]		
	5	15	135
Разлика в експресията на GS [%]	↑ 16%	↓ 14%	↓ 9%
p value	ns	ns	ns

(↑ - показва по-висока експресия в АЦФ; ↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ)

Инхибиращият ефект на претретирането с TE и АЦФ беше изчислен като процент нивата на иРНК в претретираните групи спрямо този в LPS третираната група, където тестваните концентрации от TE и АЦФ понижават сигнификантно експресията на ензима спрямо групата, третирана с LPS. Резултатите са представени в таблица 12.

Таблица 12. Разлики в генната експресия на *GS* в проценти между претретираните с екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* J774A.1 макрофази и такива, третираните с LPS.

Вид екстракт	ТЕ		АЦФ	
	иРНК [%]	p value спрямо LPS	иРНК [%]	p value спрямо LPS
5	↓ 60%	p<0,01	↓ 50%	p<0,001
15	↓ 60%	p<0,001	↓ 68%	p<0,001
135	↓ 53%	p<0,001	↓ 58%	p<0,05

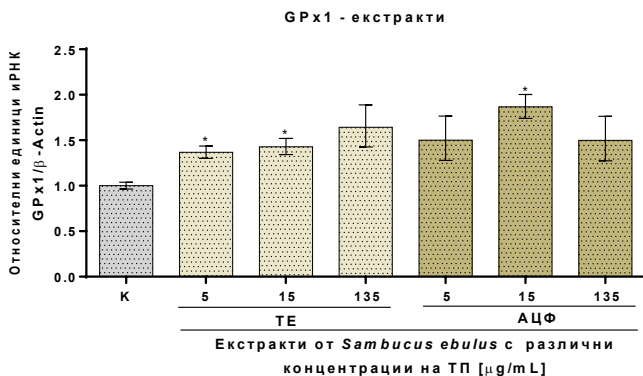
(↓ - показва по-ниска експресия в сравнение с експресията в LPS групата)

Влияние върху експресията на глутатион пероксидаза (GPx-1)

Експресия на GPx-1 в нестимулирани J774A.1 макрофази

На фиг. 13 са представени резултатите от нивата на генна експресия на ензима GPx-1. С увеличаване на концентрацията на ТЕ в хранителната среда се изменят плавно нивата на иРНК. Най-слабо, но значимо индуциране на експресията с 37% (p<0,05) се наблюдава при групата клетки, третираните с концентрация 5 µg/mL ТП от ТЕ, спрямо контролната група нетретираните клетки .

При клетките третираните с по-високата концентрация от 15 µg/mL ТП се наблюдава повишение – 43% (p<0,05) със същата статистическа значимост, като предходната концентрация. В групите клетки, третираните с АЦФ най-висока стойност на експресията на GPx-1 спрямо нетретираната контрола беше отчетено при концентрация от 15 µg/mL ТП, като достигна повишение повече от 87% (p<0,05). Останалите две концентрации – 5 µg/mL и 135 µg/mL ТП в еднаква степен индуцират експресията на ензима с 50%, без да има статистическа значимост.



Фигура 13. Влияние на екстракт от *Sambucus ebulus* върху експресията на GPx-1 в нестимулирани J774A.1 макрофаги, третирани с нарастващи концентрации от TE и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група нетретирани клетки.

*p<0,05 спрямо К

Не се наблюдава статистическа значимост в експресията на белтъка между отделните концентрации, използвани за третиране на макрофагите.

При сравнение между експресията на GPx-1 в групите клетки, третирани с еднакви концентрации двата екстракта не бяха установени значими разликите в експресията. Резултатите са изразени в проценти и са представени в таблица 13 .

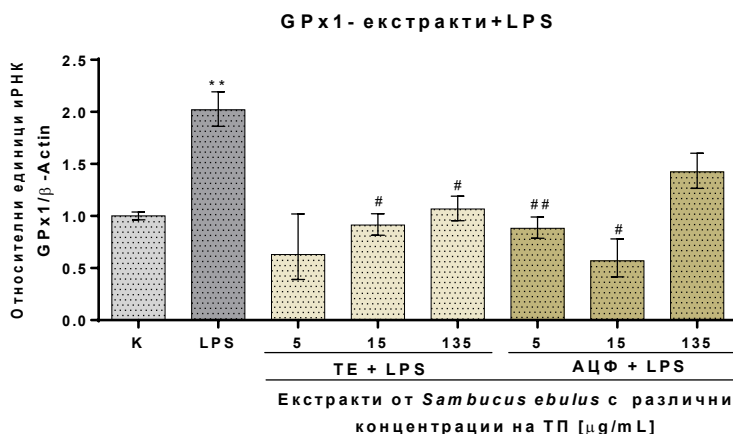
Таблица 13. Сравнение в генната експресия на GPx-1 в J774A.1 макрофаги третирани с TE и АЦФ с еднакви концентрации на ТП.

	Концентрация на ТП [μg/mL]		
	5	15	135
Разлика в експресията на GPx-1 [%]	↑ 13%	↑ 44%	↓ 14%
p value	ns	ns	ns

(↑ - показва по-висока експресия в АЦФ; ↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ)

Влияние върху транскрипционните нива на GPx-1 в J774A.1 макрофаги в условия на LPS индуциран възпалителен отговор

Фигура 14 показва резултатите от анализа на транскрипционните нива на GPx-1 при претретиране на J774A.1 макрофаги с нарастващи концентрации от ТЕ и АЦФ и последващо LPS стимулиране. В групата J774A.1 макрофаги, стимулирана с LPS експресията на гена за GPx-1 се повишава със 100% ($p < 0,01$) спрямо контролната група нетретираните клетки.



Фигура 14. Влияние на екстракт от *Sambucus ebulus* върху експресията на GPx-1 в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги, претретиран с нарастващи концентрации от ТЕ и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група нетретираните клетки.

** $p < 0,01$ спрямо K; # $p < 0,05$ спрямо LPS; ## $p < 0,01$ спрямо LPS

В две от групи клетки, претретиран с концентрации от ТЕ (15 и 135 μg/mL ТП) експресията на белтъка се понижава значимо и зависимо от приложената концентрация спрямо групата третирана с LPS ($p < 0,05$), като не се различава статистически от експресията на нетретираната контрола.

В групата макрофаги претретиран с АЦФ с концентрация 5 μg/mL ТП инхибирането на експресията спрямо групата, третирана с

LPS е значимо, с повече от 100% ($p < 0,01$). В следващата приложена концентрация от АЦФ 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП беше отчетено най-голямо потискане на експресията, спрямо LPS групата ($p < 0,05$).

При сравняване на ефекта на еднаквите концентрации от двата вида екстракт върху експресионните нива на GPx-1 не бяха установени статистически значими разлики (табл. 14).

Таблица 14. Сравнение в генната експресия на GPx-1 в J774A.1 макрофаги претретиранни с ТЕ и АЦФ с еднакви концентрации на ПФ.

	Концентрация на ТП [$\mu\text{g/mL}$]		
	5	15	135
Разлика в експресията на GPx-1 [%]	↑ 25%	↓ 34%	↑ 35%
p value	ns	ns	ns

(↑ - показва по-висока експресия в АЦФ; ↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ)

Инхибиращият ефект на билката върху експресията на GPx-1 в модела на LPS индуциран възпалителен отговор беше изчислен като процент в претретираните групи от експресията на ензима в групата клетки третиранни с LPS. Резултатите са представени в таблица 15.

Таблица 15. Разлики в генната експресия на GPx-1 между претретиранни с екстракти от плодове на Sambucus ebulus J774A.1 макрофаги в сравнение с третираните с LPS клетки в проценти.

Вид екстракт	ТЕ		АЦФ	
	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS
5	↓ 50%	$p < 0,01$	↓ 56%	$p < 0,01$
15	↓ 55%	$p < 0,01$	↓ 72%	$p < 0,05$
135	↓ 47%	$p < 0,05$	↓ 37%	$p < 0,05$

(↓ - показва по-ниска експресия в сравнение с експресията в LPS групата)

При клетките претретирани в ТЕ най-силно понижение на експресията на ензима с 55% ($p < 0,01$) беше отчетено при концентрация от 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП. При претретираните с АЦФ клетки най-голямо понижение на експресията на GPx-1 беше установено също при концентрация от 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП със 72% ($p < 0,05$).

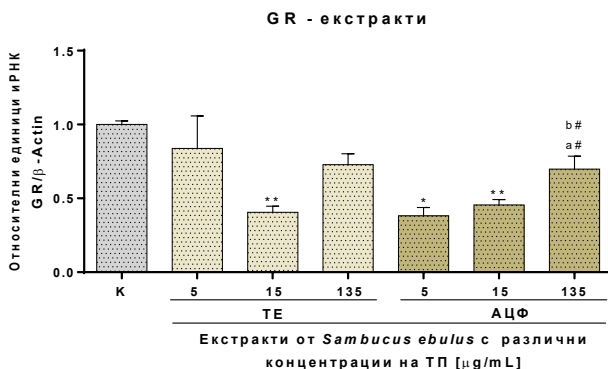
Влияние върху експресията на глутатион редуктаза (GR)

Експресия на GR в нестимулирани J774A.1 макрофаги

Ефектът на ТЕ и АЦФ върху експресията на антиоксидантния ензим глутатион редуктаза (GR) е показан на фиг. 14. Степента на експресия на GR в J774A.1 макрофаги беше инхибирана от всички приложени концентрации на ТЕ и АЦФ в хранителната среда. Концентрация на ТЕ от 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП понижава с 60% ($p < 0,01$) експресията на ензима спрямо нетретираната контрола. Понижение на експресията спрямо нетретираната контрола беше отчетено и в останалите две приложени концентрации от ТЕ като не беше установена статистическа значимост.

При клетките третирани с АЦФ се наблюдава понижение на експресията, като най-ниската концентрация (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП) понижава експресията в най-голяма степен спрямо нетретираната контрола – с 62% ($p < 0,05$), следвано от 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП, където установеното понижение беше по-ниско, но също така значимо – 55% ($p < 0,01$). Най-слабо, несигнификантно понижение беше наблюдавано при високата приложена концентрация от АЦФ от 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП.

Статистически значимо понижение на експресиите беше установена при сравнение на групите третирани с концентрации от 5 със 153 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП на АЦФ съответно с 32% ($p < 0,05$) и 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП със 153 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП на АЦФ - 25% ($p < 0,05$).



Фигура 14. Влияние на екстракт от *Sambucus ebulus* върху експресиата на GR в нестимулирани J774A.1 макрофаги, третирани с нарастващи концентрации от TE и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група нетретирани клетки.

*p<0,05 спрямо К; **p<0,01 спрямо К; a#p<0,05 спрямо АЦФ 5; b#p<0,05 спрямо АЦФ 15.

Най-ниската, приложена концентрация от 5 μg/mL ТП от АЦФ, в най-висока степен понижава експресиата на ензима GR, спрямо същата концентрация от ТЕ. При останалите две концентрации, разликите в експресионните нива на ензима са минимални.

Таблица 16. Сравнение в генната експресия на GR в J774A.1 макрофаги третирани с еднакви концентрации от TE и АЦФ.

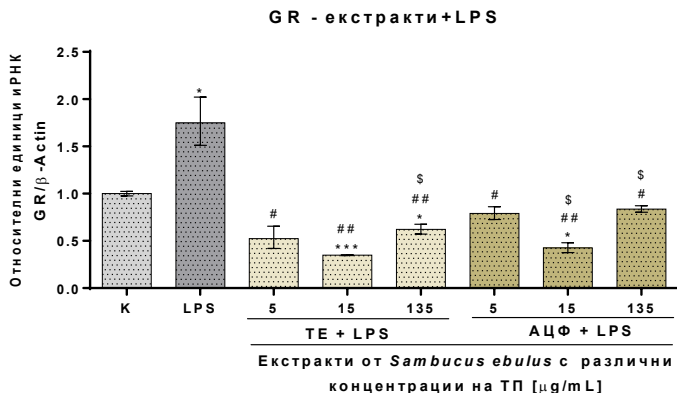
	Концентрация на ТП [μg/mL]		
	5	15	135
Разлика в експресиата на GR [%]	↓ 46%	↑ 5%	↓ 3%
p value	ns	ns	ns

(↑ - показва по-висока експресия в АЦФ; ↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ)

Експресия на GR в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги

В модела на LPS стимулиран възпалителен отговор претретиранието на клетките с екстракта и фракцията понижи стимулиращия ефект на LPS върху експресиата на GR (фиг. 15).

Контролната група стимулирана с LPS повиши значимо експресията на GR със 75% ($p < 0,05$).



Фигура 15. Влияние на екстракт от *Sambucus ebulus* върху експресията на GR в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги, претретиран с нарастващи концентрации от ТЕ и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група нетретираните клетки.

* $p < 0,05$ спрямо К; *** $p < 0,001$ спрямо К; # $p < 0,05$ спрямо LPS; ## $p < 0,01$ спрямо LPS; § $p < 0,05$ спрямо ТЕ и АЦФ 15

Всички приложени концентрации от екстракта и фракцията, с които бяха претретираните клетки понижиха степента на експресия на ензима с спрямо групата, третирана с LPS. Установените нива на генна експресия бяха в стойности по-ниски от тези на нетретираната контрола.

При концентрация от 15 µg/mL ТП от ТЕ в хранителната среда нивото на понижение беше значимо със 80% ($p < 0,01$) спрямо групата третирана с LPS, като нивото на експресия е значимо по-ниско и от това на нетретираната контрола с 65% ($p < 0,001$). Останалите две приложени концентрации от ТЕ също инхибират експресията на ензима в различна степен спрямо групата третирана с LPS, както и спрямо нетретираната контролна група съответно с 48% за концентрация от 5 µg/mL ТП и с 38% ($p < 0,05$) за концентрация от 135 µg/mL ТП.

Сходен беше ефектът и на АЦФ, където в групата, претретирана с концентрация от 15 µg/mL ТП беше установено значимо понижението на експресията спрямо групата третирана с LPS със 133% ($p < 0,01$), както и спрямо нетретираната контрола 57% ($p < 0,05$). Останалите две приложени концентрации 5 и 135 µg/mL ТП в еднаква степен инхибират експресията на GR.

Сравнението на експресиите на GR в групите, претретирани с различни концентрации от един и същ екстракт установи значима разлика от 28% ($p < 0,05$) между концентрация от 15 и 135 µg/mL ТП за ТЕ. Същото сравнение при макрофагите, претретирани с АЦФ установи значими разлики между концентрация от 5 и 15 µg/mL ТП с 36% ($p < 0,05$) и между 15 и 135 µg/mL ТП с 42% ($p < 0,05$).

Таблица 16. Сравнение в генната експресия на GR в J774A.1 макрофаги претретирани с ТЕ и АЦФ с еднакви концентрации на ТП.

	Концентрация на ТП [µg/mL]		
	5	15	135
Разлика в експресията на GR [%]	↑ 27%	↑ 7%	↑ 22%
p value	ns	ns	ns

(↑ - показва по-висока експресия в АЦФ; ↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ)

При сравняване на експресиите на GR в групите, претретирани с еднакви концентрации от двата екстракта беше установено несигнификантно по-високи нива на иРНК в групите, претретирани с АЦФ, спрямо тези, претретирани с ТЕ. Резултатите в проценти са представени в таблица 17.

Ефектът на билката върху експресията на GR в модела на LPS индуциран възпалителен отговор беше изчислен като процент от експресията на ензима в групата клетки третирани с LPS и са представени в Таблица 27. Всички приложени концентрации от ТЕ значимо понижават експресията на GR, сравнено с групата третирана с LPS. В групите, претретирани с АЦФ и трите приложени концентрации сигнификантно понижават експресията, като най-висок процент понижение беше установено за групата, претретирана с концентрация от 15 µg/mL ТП.

Таблица 17. Разлики в генната експресия на GR в проценти между претретираните с екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* J774A.1 макрофаги в сравнение с третираните с LPS.

Вид екстракт	ТЕ		АЦФ	
	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS
5	↓ 70%	p<0,05	↓ 55%	p<0,01
15	↓ 80%	p<0,01	↓ 76%	p<0,01
135	↓ 65%	p<0,01	↓ 58%	p<0,05

(↓ - показва по-ниска експресия в сравнение с експресията в LPS групата)

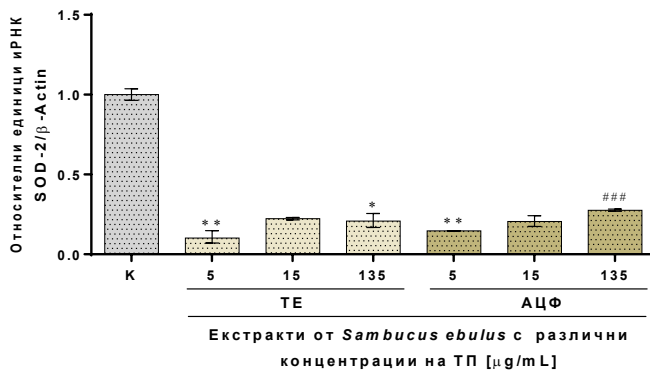
Влияние върху транскрипционните нива на SOD-2

Експресия на SOD-2 в нестимулирани J774A.1 макрофаги

В нестимулирани макрофаги експресията на ензима SOD-2 се инхибира в приблизително еднаква степен и при трите приложени концентрации от ТЕ (Фиг. 16) в сравнение с нетретираната контрола. Значимо по-ниска експресия беше установена при концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП с 90% ($p<0,01$), както и при концентрация от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП с 80% ($p<0,05$). Не бяха установени сигнификантни разлики при сравнение между експресиите при третиране с различните концентрации от ТЕ.

Близки по стойност бяха установените нива на генна експресия в макрофагите, третирани с АЦФ. Значимо понижение се наблюдава при концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП с 85% ($p<0,01$). Значително по-висока стойност на експресията беше наблюдавана при групата, третирана с концентрация от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП спрямо концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП с 13% ($p<0,001$).

SOD-2 - екстракти



Фигура 16. Влияние на екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* върху експресията SOD-2 в нестимулирани J774A.1 макрофаги. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група клетки.

*p<0,05 спрямо К; **p<0,01 спрямо К; ###p<0,001 спрямо АЦФ 5.

С цел да установим влиянието на фракционирането върху ефекта на екстракта беше направено сравнение между експресията на SOD-2 при клетки, третирани с еднакви концентрации от двата вида екстракт. Разликите в експресията са израени в проценти и са представени в Таблица 18.

Таблица 18. Сравнение в нивата на генна експресия на SOD-2 в J774A.1 макрофаги третирани с еднакви концентрации от ТЕ и АЦФ.

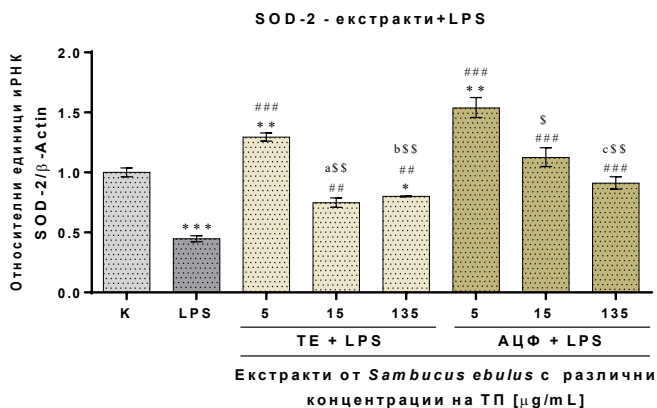
Разлика в експресията на SOD-2 [%]	Концентрация на ТП [µg/mL]		
	5	15	135
	↑ 5%	↓ 2%	↑ 7%
p value	ns	ns	ns

(↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ; ↑ - показва по-висока експресия в АЦФ)

Експресия на SOD-2 в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги

При стимулиране на клетките с LPS беше установено значимо по-ниско ниво на експресията на ензима спрямо нетретираната

контрола с 55% ($p < 0,001$). При претретиране на J774A.1 макрофагите с екстрактите и следващ индуциран възпален отговор с LPS се отчита значимо индуциране на експресията на белтъка и при ТЕ и при АЦФ, която при концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП дори надвишава тази на нетретираната контрола.



Фигура 17. Влияние на екстракт от плодове на *Sambucus ebulus* върху експресията на SOD-2 в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги, претретиран с ТЕ и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група клетки.

* $p < 0,05$ спрямо К; ** $p < 0,01$ спрямо К; *** $p < 0,001$ спрямо К; ### $p < 0,01$ спрямо LPS; ### $p < 0,001$ спрямо LPS; \$ $p < 0,05$ спрямо АЦФ+LPS 5; a\$\$ $p < 0,01$ спрямо ТЕ+LPS 5; b\$\$ $p < 0,01$ спрямо ТЕ+LPS5; c\$\$ $p < 0,01$ спрямо АЦФ+LPS 5.

Най-висока експресия беше установена в групата, претретирана с ТЕ с концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП спрямо групата, стимулирана с LPS с 84% ($p < 0,001$), която е значимо по-висока и от експресията на нетретираната контрола ($p < 0,01$). В следващите две концентрации от 15 и 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП установената експресия беше също значимо по-висока от тази на групата, третирана с LPS ($p < 0,01$), но не надвишава тази на нетретираната контрола.

При концентрации от 15 и 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП се наблюдаваше значимо понижаване на експресията спрямо ниската концентрация от 5

µg/mL ТП съответно с – 54% (p<0,01) и с 49% (p<0,01). Максимална висока експресия в групите, претретиран с АЦФ беше постигната при ниската концентрация от 5 µg/mL ТП с 108% (p<0,001) спрямо група третирана с LPS клетки. По-ниски, но също така значими стойности на експресията спрямо групата , третирана с LPS, бяха установени и в останалите две приложени концентрации от АЦФ 15 и 135 µg/mL ТП, съответно с 67% (p<0,001) и 46% (p<0,001). По-високите концентрации от АЦФ по-слабо стимулират експресията на SOD-2 спрямо ниската концентрация от 5 µg/mL ТП, съответно с 42% (p<0,05) за концентрация от 15 µg/mL ТП и с 63% (p<0,01) за концентрация от 135 µg/mL ТП.

При сравняване на нивата на иРНК на SOD-2 при макрофагите, претретиран с еднакви концентрации от двата екстракта и при трите концентрации се наблюдаваше по-висока експресия при претретиране с АЦФ. Резултатите са изразени в проценти и са представени в Таблица 18.

Таблица 18. Сравнение в нивата на генна експресия на SOD-2 в J774A.1 макрофаги претретиран с ТЕ и АЦФ с еднакви концентрации на ТП.

	Концентрация на ТП [µg/mL]		
	5	15	135
Разлика в експресията на SOD-2 [%]	↑ 25%	↑ 37%	↑ 11%
p value	ns	ns	ns

(↑ - показва по-висока експресия в АЦФ)

За да установим ефектът на билката върху експресията на SOD-2 в модела на LPS индуциран възпалителен отговор беше изчислен като процент от експресията на белтъка в групата клетки третиран с LPS и са представени в Таблица 60. Във всички претретиран групи беше установено значимо по-висока експресия в сравнение с групата, третирана с LPS.

Таблица 19. Разлики в генната експресия на SOD-2 в проценти между претретиран с екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* J774A.1 макрофаги в сравнение с третираните с LPS.

Вид екстракт	ТЕ		АЦФ	
	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS
Съдържание на ПФ в хранителната среда ($\mu\text{g/mL}$)				
5	↑ 189%	p<0.001	↑ 244%	p<0.001
15	↑ 67%	p<0.01	↑ 152%	p<0.001
135	↑ 79%	p<0.01	↑ 104%	p<0.001

(↑- показва по-висока експресия спрямо LPS)

Обсъждане

Общото в патогенезата на повечето възпалителни заболявания е участието на оксидативния стрес, свързан с производството на АКФ от всички аеробни организми. При физиологични условия повечето от увреждащите ефекти на свободните радикали се предотвратяват от действието на антиоксидантните ензими и от вещества с различна степен на антиоксидантен капацитет, формиращи антиоксидантната защита на организма.

Към ендогенните защитни механизми на организма се отнасят вътреклетъчните ензимни антиоксидантни системи, такива като супероксид дисмутаза, която обезврежда супероксидния анион радикал, каталазата, която разгражда H_2O_2 и системата на глутатиона, която обезврежда H_2O_2 и липидни пероксиди (фиг. 27). Антиоксидантната защита включва: ендогенните антиоксиданти, които могат да бъдат с ензимна и неензимна природа и антиоксиданти постъпващи с храната.

Системата на глутатиона е най-важната вътреклетъчна АО защита. Тя е отговорна не само за обезвреждането на АКФ, но и за поддържането на редокс баланс в клетката. Сред компонентите които тя включва са окисления (GSSG) и редуциран (GSH) глутатион, ензимите глутатион пероксидаза (GPx) с кофактор елемента селен (Se) и глутатион редуктаза с кофактор $\text{NADPH}+\text{H}^+$. Синтезата на GSH в

клетката се извършва с участие на ензимите глутамат цистеин лигаза (GCL) и глутатион синтаза (GS)

Антиоксидантите в храните от растителен произход представляват ефективна стратегия за противодействие на това състояние.

Досега са описани няколко механизма, които обясняват противовъзпалителната активност на флавоноидите. В устната кухина и червата, тези съединения вероятно образуват стабилни антиоксидантни комплекси, взаимодействащи с микробна флора, докато в стомаха те действат като директно очистват хидропероксиди и алдехиди от метаболизма на мастни киселини. Някои изследвания предполагат, че увреждания на тъканите, свързани с оксидативен стрес, предизвикани от поглъщането на мазни храни, може да се предотврати чрез едновременна консумация на богати на флавоноиди напитки (Gorelik et al., 2008). По-ранни проучвания показват, че растителните биологично активни съединения притежават потенциал да модулират активността на различни антиоксидантни ензими (GPx, GR, GS, GCL, SOD, каталаза), предизвикани от LPS и различни други стресори, като са в състояние да възстановят клетъчната хомеостаза (Park et al., 2005; Park et al., 2011). Проучванията през последните 20 години изясниха молекулните сигнални пътища за регулиране на ензимите от синтеза на GSH. Идентифицирани са ключовите елементи и транскрипционни фактори, които са отговорни за индуциране на GCL при оксидативен стрес.

Нашата цел беше да изследваме и оценим защитното действие на екстракти от *Sambucus ebulus* върху антиоксидантния статус, индуциран от *E. coli* LPS върху J774A.1 макрофаги, чрез измерване на основни оксидативни биомаркери и въввлечените молекулни пътища. За да анализираме ефекта на TE и АЦФ J774A.1 макрофагите бяха предварително претретиран с нарастващи концентрации от екстракта и фракцията и последващо третиран със 100 ng/mL LPS.

В условията на LPS стимулиране експресията и на четирите изследвани ензима от метаболизма на глутатион се повишава, като

индукцията е статистически значима. Стимулирането на експресията на GCL и GS като ензими от *de novo* синтеза на GSH вероятно се дължи на активирането на имунният отговор, който от своя страна активира респираторен взрив. В резултат на високата продукция на АКФ се активират клетъчните антиоксидантни системи. Повишени транскрипционни нива на антиоксидантните ензими GCL и GS при LPS стимулирани макрофаги, се потвърждава и от други автори (Huang et al., 2000b; Yang et al., 2005b; Yang et al., 2008).

Подобно повишение в експресионните нива се наблюдава и при ензимите GPx, GR, GS и GCL. Вероятно увеличената концентрация на АКФ, при това третиране активира процесите на тяхното елиминиране, което налага увеличаване експресията на GPx, чиято функция да елиминира АКФ ще изчерпи наличния GSH и ще повиши нивата на GSSG. Това ще задейства регулаторните системи за възстановяване на GSH/GSSG баланса, което ще доведе до стимулиране на експресията на GR.

Полифенолите са биологично активни вещества, с доказани терапевтични ефекти в клетките и тъканите. Фенолните съединения осигуряват широк спектър от биологично активно действие. Освен широко описаните свойства на чистачи на свободни радикали, съществуването както на хидрофобните, така и хидрофилните области в молекулите на полифенолите им позволяват да взаимодействат и дифундират през биологичните мембрани и да се свързват с рецептори и ензими за осъществяване на вътреклетъчни сигнални ефекти (Bennick et al., 2002).

Една от хипотезите, които обясняват антиоксидантните ефекти, проявявани от полифенолите, е, че те действат като леки токсини или прооксиданти, активирайки много гени от антиоксидантната защита.

В настоящото изследване ние проучихме възможната роля на ензимите от метаболизма на GSH в адаптивния отговор, индуциран от антоцианини. Увеличаването на вътреклетъчните нива на GSH най-вероятно се дължат на повишена активност на GCL. В потвърждение на нашият резултат е и проучването на други автори върху ефекта на

цианидин-3-β- гликозид върху GCL активността. GSH действа като акцептор на свободни радикали и редуциращ кофактор и участието на GSH в защитата на клетките при оксидативен стрес е добре установена (Franco et al., 2009). Вътреклетъчните нива на GSH са функция на хомеостаза между изчерпване, регенерация и синтез на GSH (Venè et al., 2011). При изследвания, анализиращи транскрипцията на гена за GCL *in vitro* и *in vivo*, е установено, че множество фенолни съединения могат да увеличат нивото на този ензим като повлияват експресията на гена. Така например растителен екстракт, богат на флавоноиди, в частност кверцетин, активира промотора на гена в COS-1 и HepG2 клетки, което води до увеличено ниво на GSH (Myhrstad et al., 2002).

Различията в експресията на GPx-1 и GR при клетките, третиран с ТЕ и АЦФ би могло да се обясни с това, че билковият екстракт индуцира експресията на GPx-1, активирайки антиоксидантната защита на клетката и заедно с това той самият действа като антиоксидант, обезвреждайки АКФ, което не води до изчерпване на наличния GSH и не е необходима повишена експресия на регенериращия ензим – GR. В нашето изследване клетките третиран с ТЕ и АЦФ показват повишаване експресията на GPx ($p < 0,05$), но не и на GR в сравнение с контролните клетки. Тези резултати предполагат, че обогатен с антоцианин екстракт може да индуцира експресията на GPx вероятно чрез насочване на транскрипцията фактор Nrf2, който от своя страна, активира антиоксидантния елемент за отговор (ARE), както е докладвано за други редокси-активни фитохимикали (Na and Surh, 2008; Upadhyay and Dixit, 2015). Чрез увеличаване експресията на GPx-1 фитохимикалите в екстрактите от *S. ebulus* активират процеса на обезвреждане на АКФ с участието на ензима, който от своя страна ще изчерпва наличния вътреклетъчен GSH, в резултат на което се стимулира експресията на регулаторния ензим от синтеза на GSH, а именно GCL. Експресионните нива на ензима GPx-1 се индуцират в значителна степен (85%) ($p < 0.05$), което вероятно се дължи на потенциала на флавоноидите да мобилизират антиоксидантните ензими и да подготвят клетката за елиминиране на ефекта от оксидативния стрес.

Предполагаме, че полифенолите и в частност антоцианините са способни да елиминират АКФ, произведен от LPS стимулиране по Nrf-2-независим начин. Най-силно повишение на транскрипцията на GCL беше отчетено при пречистената антоцианинова фракция, където в съдържанието на тотални полифеноли в най-голямата част се пада на антоцианините. Биологично активните молекули, присъстващи в диетата могат да осигуряват индиректна защита срещу оксидативен стрес чрез активиране на клетъчните сигнални каскади, които подобряват антиоксидантните защитни системи (Upadhyay and Dixit, 2015). Ензими от тези системи, както и тяхното съгласувана действие насърчава динамичното регулиране на двойката GSH/GSSG. Редуцираният глутатион се регенерира, при което GSSG се редуцира до GSH от GR с консумация на НАДФН. Експресията на тези ензими ни позволява да направим оценка на способността на клетките да запазят своето функционално редокссъстояние при ендогенни (например свързани патологични състояния с дегенеративни заболявания) или екзогенни окислителни стимули на стреса.

Фенолните съединения могат да активират Nrf2, което води до индукция на детоксикиращи ензими (Gonzalez-Reyes et al., 2013). Възможно е да се активират механизми на антиоксидантна защита на две различни нива: първо, свободните радикали, произведени от прооксидантни антоцианини, могат да активират протеин кинази (напр. PI3K и PKC), които впоследствие регулират транскрипцията на Nrf-2 и второ, самите съединения могат да действат като сигнални молекули, взаимодействащи с протеин кинази, като по този начин се индуцират вътреклетъчни сигнални каскади. Nrf-2 играе критична роля в клетъчната защита срещу оксидативния стрес чрез индуциране на транскрипцията на антиоксидантни гени (Li et al., 2009). При нормални условия Nrf-2 се отделя в цитоплазмата чрез Keap1 - отрицателен регулатор на Nrf-2. Когато клетките са в условия на оксидативен стрес, окислителни модификации или фосфорилиране в Keap1 води до освобождаване на Nrf-2, който впоследствие влиза в ядрото, активира транскрипцията на гени, съдържащи антиоксидантен елемент на отговор в техните промотори (Brown et al., 2010). Nrf-2 -реагиращи гени включват глутамат-цистеин лигаза (GCL) каталитична субединица,

GCL модификатор, глутатион синтетаза, глутатион-S-трансфераза, глутатион пероксидаза и хем оксигеназа (Zhang et al., 2002; Li et al., 2009).

Много от транскрипционните фактори и сигнални молекули имат критични цистеинови остатъци, които могат да бъдат окислени и това е важен механизъм, чрез който реактивните кислородни форми регулират протеиновата функция и клетъчното сигнализиране, което може да бъде модулирано от нивата на GSH (Lu et al., 2010).

Приложените концентрации от екстракта и фракцията показват зависимост от концентрацията при стимулирането на експресията на белтъците, което би довело до намляване на АКФ, чрез симулирана на синтеза на GSH в третираните с антоцианини клетки. Тези резултати предполагат, че флавоноидите ефективно намаляват вътреклетъчните АКФ. В подкрепа на тази теза е резултата на други автори, установили, че (-) - епигалокатехин-3-галат (EGCG), основната съставка на зеления чай, който има мощно антиоксидантно действие, е показал, че блокира инхибиращия ефект на TGF- β 1 върху GCLc експресията и GSH нива в HSCs и индуцирано от TGF- β 1 HSC активиране (Fu et al., 2008).

GSH е важна променлива, която определя податливостта към LPS-индуцирано увреждане. Той потиска LPS-индуцирания възпалителен отговор и намалява клетъчната смъртност (Sun et al., 2006). Молекулярният механизъм на защитния ефект на GSH може да е свързан с неговата способност да повлиява сигнализирането TLR 4. Така ниското ниво на GSH потенцира LPS-индуцираната смъртност и TNF α секрецията. Въпреки, че са известни много състояния, свързани с ниски нива на GSH (като например Паркинсонова, ХИВ / СПИН, кистична фиброза) (Townsend et al., 2003), не е доказано, че много от тях са свързани с понижение на GCL активността или GCL експресията. Poni

Възможно е молекулярният механизъм, който стои в основата на регулацията на GCL, медирана от флавоноидите да включва активацията на транскрипционните фактори Nrf1 и Nrf2. Известно е, че Nrf1 и Nrf2 се свързват и трансактивират AREs, цис-действащите елементи, присъстващи в промоторите на двете GCL субединици.

Някои автори предполагат, че антоцианините индуцират експресията на GCL, чрез активиране на PKA, която фосфорилирайки CREB увеличава транскрипцията му и увеличава експресията на GCL (W. Zhu et al. 2012).

Предварителното третиране с полученият екстракт и пречистената от него антоцианиновата фракция ефективно противодейства на индуцирания от LPS оксидативен стрес, намалявайки количеството на АКФ, стимулирайки ендогенните антиоксидантни ензимни системи и повишавайки защитата срещу липидни, протеинови и ДНК увреждания. Претретирането с екстрактите от плодове на *Sambucus ebulus* проявява тези защитни ефекти главно чрез активиране на Nrf2 пътя, който е значително зависим от AMPK и също от модулирането на сигналния път на NF- κ B. Nrf2 е чувствителен към нива на АКФ и други про-оксиданти, но също така и антиоксиданти, включително фенолни съединения, каквито са антоцианините. Това се потвърждава от някои автори Nrf2 / ARE пътят може да бъде един от начините антоцианините да увеличават активността на GR и GPx в клетките (Shih et al, 2007; Nguyen et al. 2009).

Оксидативният стрес е резултат от дисбаланс между производството АКФ и на антиоксидантната защитна система. Оксидативният стрес причинява сериозно увреждане на клетъчната структура и функция (Mishra et al., 2007; Sakaguchi et al., 2006). SOD-2 може да елиминира АКФ (Macarthur et al., 2000). Нашето проучване показва, че ТЕ и АЦФ понижават експресията на SOD-2 в сравнение с нетретираната контролна група. Претретирането на макрофагите с екстракта и фракцията с последващо LPS стимулиране доведе до значително по-висока експресията на SOD-2, което съответства с направени по-рано проучвания върху влиянието на цианидин-3-глюкозид в *in vitro* и *in vivo* изследвания на други автори (Nasri et al., 2011). Резултатът получен в нашето изследване се потвърждава и от други автори при проучвания направени върху клетки, третирани с екстракти от ягода, преди инкубация с LPS (Lee et al., 2013; Mo et al., 2014). Тези резултати предполагат, че екстракта и фракцията от плодове на *Sambucus ebulus* могат да намалят LPS-индуцираното възпаление чрез повишаване експресията на SOD-2.

Антоцианините са известни със способността си да обезвреждат АКФ (Wang et al., 1997). Предвид това можем да предполагаме, че слабата индукция на ензима GR би могла да се дължи на факта, че полифенолите и в частност антоцианините, регулирайки антиоксидантните системи в клетката, допълнително очистват АКФ, понижавайки нивата на оксидативен стрес. Това в голяма степен би могло да не води до изчерпване на наличния GSH, въпреки завишената индукция на ензима GRx-1 при третирането на макрофагите с екстракта и фракцията. Вероятно полифенолите в това число и антоцианините обезвреждат АКФ и по този начин намаляват нивата на оксидативния стрес.

Получените данни показват, че обогатения на антоцианини екстракт от плодове на *Sambucus ebulus* може да модулира редокссъстоянието на J774A.1 макрофагите и да понижи нивата на оксидативния стрес, както и да регулира съотношението GSH/GSSG. Идентифицирането на механизмите на тези ефекти може да доведе до разработване на терапии, насочени към предотвратяване или коригиране на аномалии състояния, като се предотвратят усложнения, които могат да възникнат в резултат на променен GSH синтез.

Антиоксидантния потенциал на антоцианините се регулира от различията в химичната им структура, която се определя от броя и положението на хидроксилните групи, конюгиращите агенти, степента на гликозилиране и присъствието на пръстенни структури в тях (Van den Hoek TL et al., 1998; Zweier et al., 1987). Макар, че антиоксидантната активност е силно зависима от структура на антоцианините, някои проучвания сочат, че те не притежават сходни нива на активност за очистване на АКФ (Zweier et al., 1987; Bel et al., 2012). АКФ са високо реактивни съединения, образувани ензимно или неензимно в клетките. Те могат да причиняват увреждане на клетките директно или чрез междинни съединения в различни клетъчни сигнални пътища (Cardoso et al., 2011).

Основните механизми, на които се основава защитната активност не са добре изяснени ясни, поради оскъдните данни от *in vitro* изследвания. Това допълнително се подкрепя и от ниската бионаличност

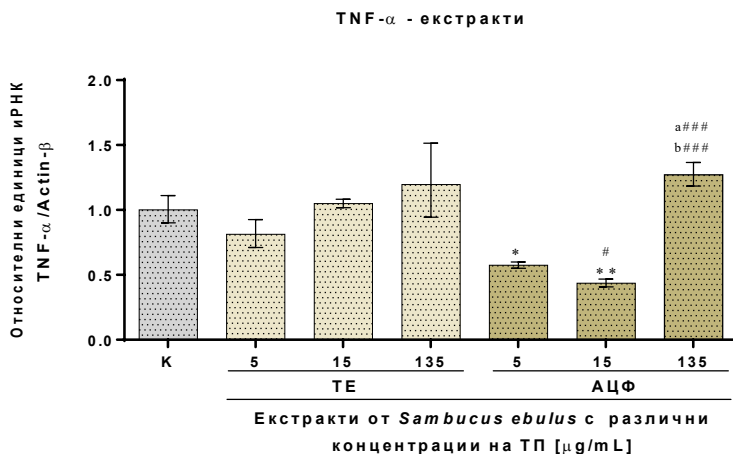
и бързият метаболизъм на полифенолите до прости феноли, алдеhideи и салицилати.

7. Изследване влиянието на тотален екстракт и антоцианинова фракция от плодове на *Sambucus ebulus* в J774A.1 макрофаги върху експресията на гени, свързани с възпалителния отговор, в условия на третиране с LPS

Влияние върху транскрипционните нива на TNF- α

Експресия на TNF- α в нестимулирани J774A.1 макрофаги

При третиране на нестимулирани J774A.1 макрофаги с избраните концентрации от ТЕ и АЦФ (5, 15, 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП) в продължение на 24 часа бяха установени следните резултати, представени на фиг. 18.



Фигура 18. Влияние на екстракт от *Sambucus ebulus* върху експресията на TNF- α в нестимулирани J774A.1 макрофаги, третирани с нарастващи концентрации от ТЕ и АЦФ. Нивата на генната експресия са изчислени спрямо контролната група клетки

* $p < 0,05$ спрямо К; ** $p < 0,01$ спрямо К; # $p < 0,05$ спрямо АЦФ 5; a### $p < 0,001$ спрямо АЦФ 5; b### $p < 0,001$ спрямо АЦФ 15.

Приложените концентрации от ТЕ не доведоха до значими промени в стойностите на нивата на генна експресия на TNF- α в клетките. В групите, третирани с АЦФ в концентрации от 5 и 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП беше установено значимо понижение съответно с 43% ($p < 0,05$) и с 56% ($p < 0,01$) спрямо контролната група нетретирани клетки.

При сравнение между експресионните нива на TNF- α в клетките, третирани с различни концентрации от ТЕ не беше установена статистическа значимост. В групите, третирани с АЦФ значима разлика беше установена между групите клетки, третирани с концентрация от 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП, спрямо тази на клетките, третирани с концентрация от 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП, в която експресията беше значително по-ниска с 13% ($p < 0,05$). Установено беше сигнификантно по-висока експресия в клетките, третирани с концентрация от 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП спрямо двете пониски концентрации от същия екстракт, съответно със 70% ($p < 0,001$) спрямо концентрация от 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП и с 83% ($p < 0,001$) спрямо концентрация от 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП.

Направено беше сравнение между експресията на TNF- α при клетки, третирани с еднакви концентрации от двата екстракта. Разликите за изразени в проценти и са представени в таблица 20.

Таблица 20. Сравнение в генна експресия на TNF- α в J774A.1 макрофаги третирани с еднакви концентрации от ТЕ и АЦФ.

	Концентрация на ТП [$\mu\text{g}/\text{mL}$]		
	5	15	135
Разлика в експресията на TNF- α [%]	↓ 24%	↓ 61%	↑ 7%
p value	ns	$p < 0,01$	ns

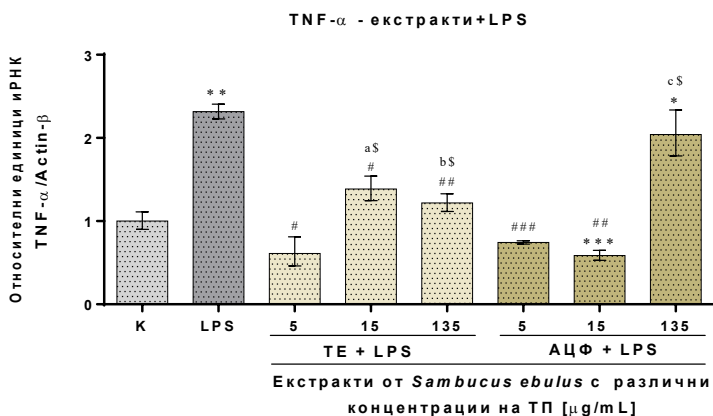
(↑ - показва по-висока експресия в АЦФ; ↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ)

Експресия на TNF- α в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги

В групата клетки, третирана с индуктора LPS, експресията беше повишена със 132% ($p < 0,01$) спрямо нетретираната контрола (фиг. 29). В условията на LPS индуциран възпалителен отговор, клетките претретирани с ТЕ и АЦФ показаха понижена в значителна степен експресия на белтъка спрямо групата, третирана с LPS. В някои от

групите експресията достига стойности по-ниски дори от тези на нетретрираната контрола.

Ефектът на ТЕ се наблюдава при всички приложени концентрации с различна значимост. За концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП разликата на експресията спрямо групата, стимулирана с LPS е със 171% ($p < 0,05$), което е най-ниската стойност на експресията, измерена за всички групи клетки. Значимо по-ниска експресия спрямо групата, третирана с LPS се наблюдаваше и при концентрации от 15 и 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП, съответно с 92% ($p < 0,05$) и със 110% ($p < 0,01$).



Фигура 19. Влияние на екстракт от *Sambucus ebulus* върху експресията на TNF- α в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги, претретиран с нарастващи концентрации от ТЕ и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група клетки.

* $p < 0,05$ спрямо K; ** $p < 0,01$ спрямо K; # $p < 0,05$ спрямо LPS; ## $p < 0,01$ спрямо LPS; ### $p < 0,001$ спрямо LPS; a\$ $p < 0,05$ спрямо ТЕ 5+LPS; b\$ $p < 0,05$ спрямо ТЕ 5+LPS; c\$ $p < 0,05$ спрямо АЦФ 15+LPS.

При клетките, претретиран с АЦФ сигнификантно понижение на експресията на TNF- α , сравнено с клетките третиран с LPS беше, установено при концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП със 158% ($p < 0,001$). В следващата, приложена концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП понижението на експресията беше най-ниското установено за всички приложени

концентрации, както от АЦФ, така и от ТЕ – със 173% ($p < 0,01$) спрямо клетките, третирани с LPS и с 41% ($p < 0,001$) спрямо нетретираната контрола. Значително по-слаб ефект се наблюдаваше в групата, претретирана с АЦФ в концентрация от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП, където експресията надвишаваше тази на нетретираната контрола със 100% ($p < 0,05$).

При сравняване на ефекта на различните концентрации на ТЕ значима разлика в експресията беше установен между клетките, претретирани с концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП и тези, претретирани с 15 и 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП съответно със 76% ($p < 0,05$) и с 60% ($p < 0,05$).

Установено беше сигнификантно по-висока експресия на TNF- α в групата клетки, претретирани с високата концентрация (135 $\mu\text{g/mL}$ ТП) от АЦФ спрямо групата, претретирана с концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП, като разликата е 146% ($p < 0,05$).

Таблица 21. Сравнение в нивата на генна експресия на TNF- α в J774A.1 в макрофаги претретирани с ТЕ и АЦФ с еднакви концентрации на ПФ.

	Концентрация на ТП [$\mu\text{g/mL}$]		
	5	15	135
Разлика в експресията на TNF- α [%]	↑ 13%	↓ 80 %	↑ 82%
p value	ns	$p < 0,01$	ns

(↑ - показва по-висока експресия в АЦФ; ↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ)

За да установим ефекта на пречистване на екстракта беше направено сравнение между експресиите на TNF- α в групите, претретирани с еднакви концентрации от ТЕ и АЦФ. Резултатите са представени в таблица 29. Установено беше статистически значимо по-ниска експресия на TNF- α при претретиране с АЦФ, в сравнение с ТЕ, при концентрации от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП със 80% ($p < 0,01$).

При сравняване на ефекта на еднаквите концентрации от двата вида екстракт беше установено, че всички приложени концентрации от

ТЕ значимо понижават експресията на TNF- α сравнени с групата третирана с LPS. В групите, претретиран с АЦФ двете по-ниски концентрации от 5 и 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП сигнификантно понижават експресията, като най-висок процент понижение беше установено за групата, претретирана с концентрация от 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП.

Таблица 22. Разлики в генната експресия на TNF- α в проценти между претретиран с екстракти от плодове на *S.ebulus* в J774A.1 макрофаги и такива, третиран с LPS.

Вид екстракт	ТЕ		АЦФ	
	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS
5	↓ 65%	p<0,001	↓ 68%	p<0,001
15	↓ 40%	p<0,05	↓ 75%	p<0,01
135	↓ 47%	p<0,01	↓ 12%	ns

(↓ - показва по-ниска експресия спрямо LPS)

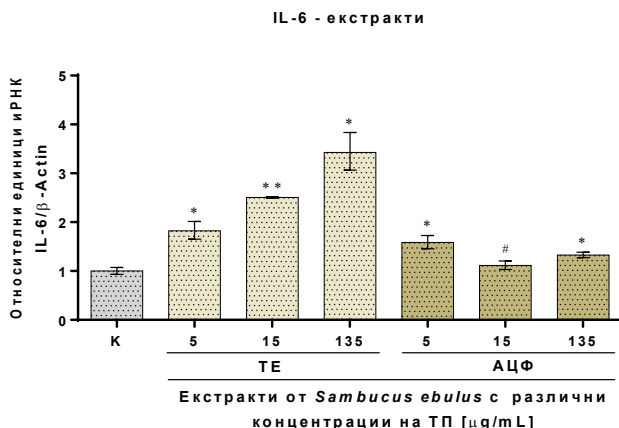
Влияние върху транскрипционните нива на IL-6

Експресия на IL-6 в нестимулирани J774A.1 макрофаги

IL-6 е сред основните цитокини от острата фаза на възпалението. При третирането на макрофагите с избраните концентрации от ТЕ (5, 15 и 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП) беше установено значимо индуциране на експресията на цитокина, съответно с 82% (p<0,05), 150% (p<0,01) и с 243% (p<0,05).

АЦФ в много по-ниска степен индуцира експресията на цитокина, като ниската концентрация от 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП най-силно повишават експресията, с 58% (p<0,05), спрямо нетретираната контролна група. Сигнификантно повишение на експресията на IL-6 беше установено и при високата концентрация АЦФ от 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП, с 33% (p<0,05).

При сравнение между експресиите в клетките, третирани с различни концентрации от ТЕ не беше установена статистическа значимост. Значима разлика в експресията на групите клетки, третирани с АЦФ беше установена между клетките, третирани с АЦФ с концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП и концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП, където се наблюдава понижение на експресията с 47% ($p < 0,05$).



Фигура 19. Влияние на ТЕ и АЦФ от плодове на *Sambucus ebulus* върху експресията на IL-6 в нестимулирани J774A.1 макрофаги. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група клетки.

* $p < 0,05$ спрямо К; ** $p < 0,01$ спрямо К; # $p < 0,05$ спрямо АЦФ 5.

Направено беше сравнение между експресията на IL-6 при клетки, третирани с еднакви концентрации от двата екстракта. Разликите са изразени в проценти и са представени в таблица 23.

Таблица 23. Сравнение в генната експресия на IL-6 в J774A.1 макрофаги третирани с еднакви концентрации от ТЕ и АЦФ.

	Концентрация на ТП [$\mu\text{g/mL}$]		
	5	15	135
Разлика в експресията на IL-6 [%]	↓ 24%	↓ 140%	↑ 210%
p value	ns	$p < 0,01$	ns

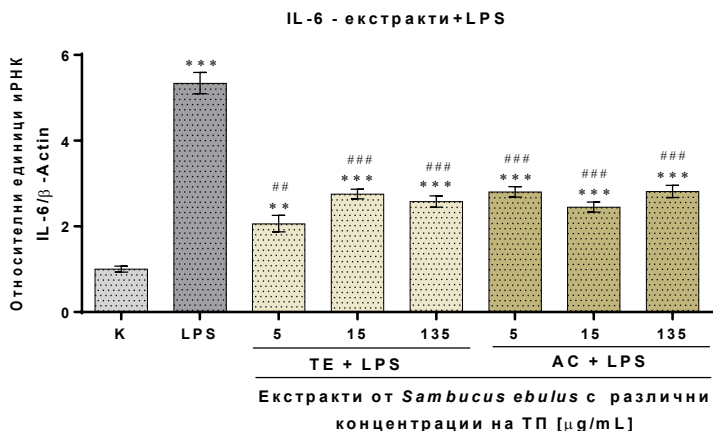
(↑ - показва по-висока експресия в АЦФ; ↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ)

Значима разлика ($p < 0,01$) беше наблюдавана в групите клетки, третираны с концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП от двата екстракта – ТЕ и АЦФ.

Експресия на IL-6 в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги

В условията на LPS индуциран възпалителен отговор клетките претретираны с ТЕ и АЦФ понижават в значителна степен експресията на белтъка спрямо групата, третирана с LPS (фиг. 20). В контролната група клетки, третирана с индуктора LPS, експресията беше повишена със 434% ($p < 0,001$) спрямо нетретираната контрола.

Всички приложени концентрации от ТЕ доведоха до сигнификантно по-висока експресия на цитокина спрямо нетретираната контрола, съответно със 100 % ($p < 0,01$) за концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП, със 175% ($p < 0,001$) за концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП и със 158% ($p < 0,001$) за концентрация от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП. Със същата значимост приложените концентрации от ТЕ понижават експресията на IL-6 спрямо групата, третирана с LPS.



Фигура 20. Влияние на ТЕ и АЦФ от плодове на *Sambucus ebulus* върху експресията на IL-6 в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група клетки.

** $p < 0,01$ спрямо К; *** $p < 0,001$ спрямо К; ## $p < 0,01$ спрямо LPS; ### $p < 0,01$ спрямо LPS.

В групите, претретирани с АЦФ всички приложени концентрации в еднаква степен индуцират експресията на цитокина спрямо нетретираната контролна група с повече от 150% ($p < 0,001$) и също така значимо понижават експресията в сравнение с групата третирана с LPS повече от 250% ($p < 0,001$).

Не бяха установени статистически различия в експресионните нива на IL-6 в групите, претретирани с различни концентрации както от ТЕ, така и от АЦФ

За да установим ефекта на пречистване на екстракта беше направено сравнение между експресиите на IL-6 в групите, претретирани с еднакви концентрации от ТЕ и АЦФ. Резултатите са представени в таблица 24. Не бяха установени значими разлики в експресията.

Таблица 24. Сравнение в нивата на генна експресия на IL-6 в J774A.1 макрофаги претретирани с ТЕ и АЦФ с еднакви концентрации на ТП.

	Концентрация на ТП [$\mu\text{g/mL}$]		
	5	15	135
Разлика в експресията на IL-6 [%]	↑ 75%	↓ 30%	↑ 23%
p value	ns	ns	ns

(↑ - показва по-висока експресия в АЦФ; ↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ)

За да се установи, в каква степен претретирането с ТЕ и АЦФ понижава ефекта на LPS, експресионните нива на IL-6 бяха изчислени като процент от експресията на LPS групата, която е приравнена на 100% и са представени в таблица 25. Всички приложени концентрации от ТЕ значимо понижават експресията на IL-6 сравнение с групата третирана с LPS. В групите, претретирани с АЦФ и трите приложени концентрации сигнификантно понижават експресията, като най-висок процент понижение беше установено за групата, претретирана с концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП.

Таблица 25. Разлики в генната експресия в проценти на IL-6 в проценти между претретирани с екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* J774A.1 макрофаги и такива третирани с LPS.

Вид екстракт	ТЕ		АЦФ	
	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS
5	↓ 61%	p<0,01	↓ 48%	p<0,001
15	↓ 48%	p<0,001	↓ 54%	p<0,001
135	↓ 52%	p<0,001	↓ 47%	p<0,001

(↓ - показва по-ниска експресия спрямо LPS)

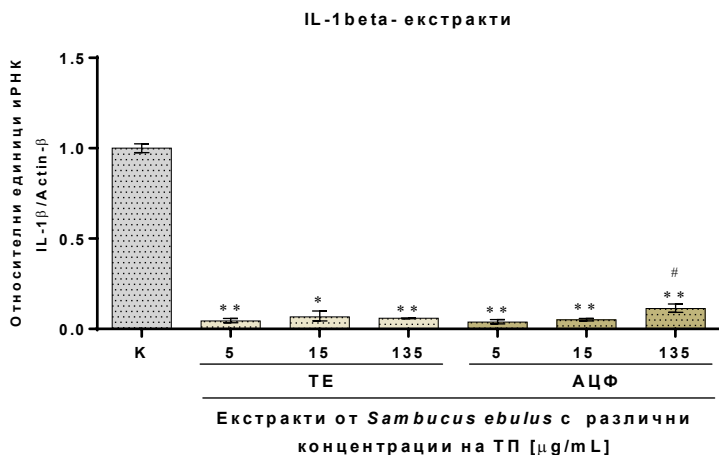
Влияние върху транскрипционните нива на IL- 1β

Експресия на IL- 1β в нестимулирани J774A.1 макрофаги

IL- 1β е един от основните цитокини, отговорни за острата фаза на възпаление. И трите концентрации от ТЕ и АЦФ понижават експресията на IL-1β спрямо нетретираната контролна група макрофаги (фиг. 32). Статистическа значимост в понижението беше установена при ниските концентрации от ТЕ – за концентрация от 5 μg/mL ТП с 96% (p<0,01) и за концентрация от 15 μg/mL ТП с 94% (p<0,05).

С еднаква значимост (p<0,01) всички приложени концентрации от АЦФ доведоха до по-ниска експресия на цитокина спрямо нетретираната контрола с над 90%.

При сравнение между ефекта на различните приложени концентрации от ТЕ не беше установена значима разлика. При АЦФ беше наблюдавана статистически значима разлика между ефекта на концентрации от 15 μg/mL ТП и 135 μg/mL ТП (p<0,05).



Фигура 21. Влияние на екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* върху експресията на IL-1β в нестимулирани J774A.1 макрофаги, третирани с нарастващи концентрации от ТЕ и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група клетки.

*p<0,05 спрямо К; **p<0,01 спрямо К; #p<0,05 спрямо АЦФ 15

Пречистването на екстракта не повлиява ефекта върху експресията на IL-1β, както беше установено при направения анализ между експресиите на IL-1β в групите, третирани с еднакви концентрации от двата вида екстракт (табл. 26).

Таблица 26. Сравнение в нивата на генна експресия на IL-1β в J774A.1 макрофаги третирани с еднакви концентрации от ТЕ и АЦФ.

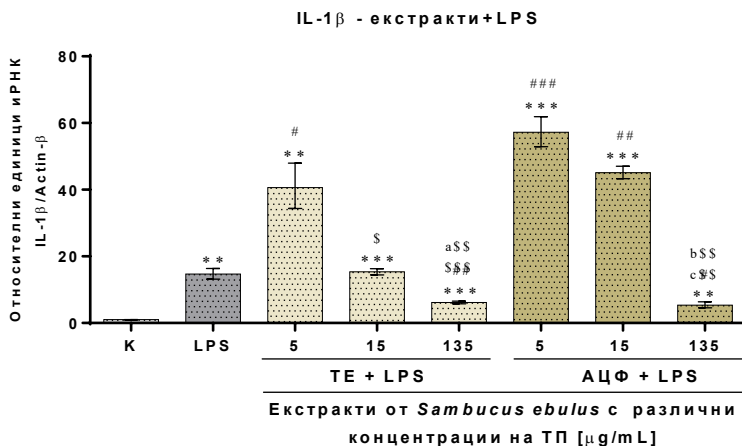
	Концентрация на ТП [μg/mL]		
	5	15	135
Разлика в експресията на IL-1β [%]	-	↓ 2%	↑ 1%
p value	-	ns	ns

(↑ - показва по-висока експресия в АЦФ; ↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ)

Експресия на IL-1β в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги

При проследяване на експресията на цитокина в условия на LPS индуциран възпалителен отговор бяха установени следните резултати,

представени на (фиг. 22). Под действие на LPS в макрофагите експресията на белтъка се индуцира над 14 пъти ($p < 0,01$), което потвърждава силата му на медиатор на възпалението.



Фигура 22. Влияние на екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* върху експресията на IL-1 β в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги, претретирани с нарастващи концентрации от ТЕ и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група клетки.

** $p < 0,01$ спрямо К; *** $p < 0,001$ спрямо К; ## $p < 0,01$ спрямо LPS; ### $p < 0,01$ спрямо LPS; \$ $p < 0,05$ спрямо TE+LPS 5; a\$\$ $p < 0,01$ спрямо TE+LPS 5; b\$\$\$ $p < 0,01$ спрямо АЦФ+LPS 5; c\$\$\$ $p < 0,001$ спрямо АЦФ+LPS 15; \$\$\$ $p < 0,001$ спрямо TE+LPS 15.

При макрофагите, претретирани с концентрация от 5 μg/mL ТП беше наблюдавано многократно, сигнификантно повишение на експресията ($p < 0,05$) спрямо групата претретрирана с LPS. При високата концентрация от 15 μg/mL ТП експресията на IL-1 β се доближава до тази в групата, третирана с LPS, докато в най-високата приложена концентрация беше установено двукратно понижение на експресията спрямо групата, третирана с LPS ($p < 0,01$). И трите приложени концентрации от ТЕ повишават сигнификантно експресията на цитокина спрямо нетретрираната контролна група, като по-висока

значимост беше установена при концентрации от 15 и 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП ($p < 0,001$) в сравнение с ниската концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП ($p < 0,01$).

В клетките претретираните с АЦФ експресията на IL-1 β беше повишена значимо при групите, претретираните с концентрации от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП със 150 % ($p < 0,001$) и с концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП с 50% ($p < 0,01$), спрямо групата, третираната с LPS. При високата концентрация от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП беше установено значимо понижение на експресията с 93% ($p < 0,05$), спрямо клетките, третирани с LPS. Всички приложени концентрации от АЦФ значимо повишават експресията на цитокина спрямо нетретираната контрола – като за концентрации от 5 и 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП ($p < 0,001$), а за концентрация от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП ($p < 0,01$).

Сравнението между ефекта на различните концентрации от ТЕ върху експресията на IL-1 β установи статистическо значимо по-ниска експресия между клетките, претретираните с концентрация 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП и 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП с 250% ($p < 0,05$), между концентрация 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП и 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП с повече от 340% ($p < 0,01$), както и между концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП и 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП със 121% ($p < 0,001$).

Подобно, зависимо от приложената концентрация понижение на експресията беше установено и при сравнение на различните концентрации от АЦФ, където при клетките претретираните с концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП и 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП беше установено понижение с над 500% ($p < 0,01$). Значимо понижение беше установено и между клетките, претретираните с 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП и тези, претретираните с 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП – с 400% ($p < 0,01$).

Таблица 27. Сравнение в нивата на генна експресия на IL-1 β в J774A.1 макрофаги претретираните с ТЕ и АЦФ с еднакви концентрации на ТП.

	Концентрация на ТП [$\mu\text{g/mL}$]		
	5	15	135
Разлика в експресията на IL-1β [%]	↑ 16%	↑ 30%	↓ 1%
p value	ns	$p < 0,001$	ns

(↑ - показва по-висока експресия в АЦФ; ↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ)

За да установим ефекта на пречистване на екстракта беше направено сравнение между експресиите на IL-1 β в групите, претретиран с еднакви концентрации от двата екстракта (ТЕ и АЦФ). Резултатите са представени в Таблица 27.

Значимо повишение на експресията беше установено при концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП за АЦФ, в сравнение с ТЕ с 30% ($p < 0,001$).

Инхибиращият ефект на претретирането с ТЕ и АЦФ беше изчислен като процент на нивата на иРНК в претретираните групи спрямо този в LPS третираната група и са представени в Таблица 28. Ниските концентрации от ТЕ и АЦФ повишават значимо експресията на IL-1 β спрямо LPS, докато високите концентрации понижават експресията.

Таблица 28. Разлики в генната експресия на IL-1 β в проценти между претретиран с екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* J774A.1 макрофаги и такива, третиран с LPS.

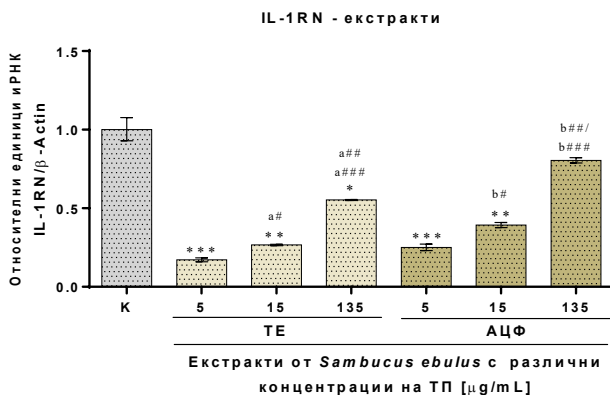
Вид екстракт	ТЕ		АЦФ	
	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS
5	↑ 184%	$p < 0,05$	↑ 298%	$p < 0,01$
15	↑ 12%	ns	↑ 215%	$p < 0,05$
135	↓ 50%	$p < 0,05$	↓ 55%	$p < 0,05$

(↑ - показва по-висока експресия спрямо LPS; ↓ - по-ниска експресия спрямо LPS)

Влияние върху транскрипционните нива на IL- 1RN

Експресия на IL- 1RN в нестимулирани J774A.1 макрофаги

На фигура 23 са представени резултатите от експресията на IL-1RN при третиране на клетките с избраните концентрации от ТЕ и АЦФ. При ТЕ беше установено дозозависимо понижаване на експресията на белтъка спрямо нетретираната контрола. Ниската концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП в най-висока степен понижаваша експресията с 83% ($p < 0,001$).



Фигура 23. Влияние на екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* върху експресията на IL-1RN в нестимулирани J774A.1 макрофаги, третирани с нарастващи концентрации от ТЕ и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група клетки.

* $p < 0,05$ спрямо К; ** $p < 0,01$ спрямо К; *** $p < 0,001$ спрямо К; a# $p < 0,05$ спрямо ТЕ 5; b# $p < 0,05$ спрямо АЦФ 5; a## $p < 0,01$ спрямо ТЕ 5; b## $p < 0,01$ спрямо АЦФ 5; a### $p < 0,001$ ТЕ 15; b### $p < 0,001$ спрямо АЦФ 15;

С увеличаване на концентрацията на екстракта в хранителната среда, понижението на експресията намалява. Следващите две концентрации от 15 и 135 μg/mL ТП понижават експресията съответно със 73% ($p < 0,01$) и с 45% ($p < 0,05$).

Същата тенденция се наблюдава и при АЦФ, където концентрация от 5 μg/mL ТП в хранителната среда понижават значимо експресията със 75% ($p < 0,001$) спрямо контролната група. Концентрация от 15 μg/mL ТП понижават експресията с 61% ($p < 0,01$), а за концентрация от 135 μg/mL ТП беше установено понижение с 20%.

При направеното сравнение между ефекта на приложените различни концентрации от ТЕ беше установена сигнификантна разлика между концентрация от 5 μg/mL ТП и 15 μg/mL ТП с 10% ($p < 0,05$). Значимост беше установена при сравнение и между същата концентрация от 5 μg/mL ТП и концентрация от 135 μg/mL ТП с 38%

($p < 0,01$), както и между концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП и 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП с 29% ($p < 0,001$).

Статистическа значимост беше установена и при сравнение между експресионните нива на IL-1RN при клетки, третирани с различните концентрации от АЦФ. Повишението на експресията на клетките, третирани с концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП спрямо тези, третирани с 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП е с 14% ($p < 0,05$). Сравнението между концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП и 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП установи сигнификантно повишение на експресията с 41% ($p < 0,01$), а между концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП и 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП с 55% ($p < 0,001$).

С цел да установим влиянието на фракционирането върху ефекта на екстракта беше направено сравнение между експресията на IL-1RN при клетки, третирани с еднакви концентрации от двата вида екстракт. Разликите в експресията са изразени в проценти и са представени в Таблица 29. И трите приложени концентрации от АЦФ значимо повишават експресията на белтъка в сравнение с ТЕ.

Таблица 29. Сравнение в нивата на генна експресия на IL-1RN в J774A.1 макрофаги третирани с еднакви концентрации от ТЕ и АЦФ.

	Концентрация на ТП [$\mu\text{g/mL}$]		
	5	15	135
Разлика в експресията на IL-1RN [%]	↑ 8%	↑ 12%	↑ 25%
p value	$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,01$

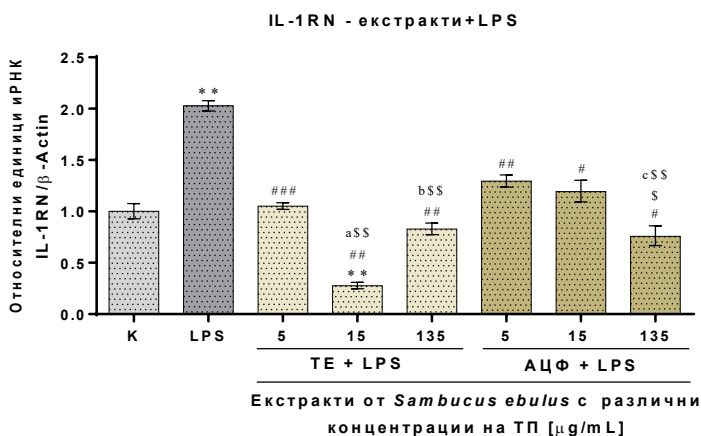
(↑ - показва по-висока експресия в АЦФ; ↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ)

Експресия на IL-1RN в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги

В условията на LPS индуциран възпалителен отговор беше установено повишение експресията на IL-1RN в групата третирана с LPS със 100% ($p < 0,01$) спрямо нетретираната контролна група. При претретиране на макрофагите с ТЕ експресията на белтъка беше значимо понижена като достигна стойностите равни на нетретираната контрола както и значимо по-ниски от нея, при третиране с концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП с 73% ($p < 0,01$). И трите приложени концентрации от ТЕ значимо понижават експресията спрямо клетките

третиран с LPS, съответно за концентрация от 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП с 93% ($p<0,001$), за концентрация от 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП с 176% ($p<0,01$) и за концентрация от 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП с 120% ($p<0,01$).

Значимост в разликите в експресиите при сравнение между различните концентрации на ТЕ беше установена между концентрация от 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП и 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП, където разликата беше 77% ($p<0,01$). Между концентрации от 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП и 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП беше установено сигнификантна разлика от 55% ($p<0,01$) в експресията на IL-1RN.



Фигура 23. Влияние на екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* върху експресията на IL-1RN в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги, претретиран с нарастващи концентрации от ТЕ и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група клетки.

** $p<0,01$ спрямо К; # $p<0,05$ спрямо LPS; ## $p<0,01$ спрямо LPS; ### $p<0,001$ спрямо LPS; \$ $p<0,05$ спрямо АЦФ+LPS 5; a\$\$ $p<0,01$ спрямо ТЕ+LPS 5; b\$\$ $p<0,01$ спрямо ТЕ+LPS 15; c\$\$ $p<0,01$ спрямо АЦФ+LPS 15.

В групите макрофаги, претретиран с АЦФ понижението на експресията беше съответно с 72% ($p<0,01$) за концентрация от 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП и с 80% ($p<0,05$) за концентрация от 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП спрямо групата третирана с LPS. Най-голямо понижението на експресията спрямо групата, третирана с LPS беше установено при клетките, претретиран

с 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП с 129% ($p < 0,05$). Значима разлика от 53% ($p < 0,01$) в експресията на IL-1RN беше установена между групата, третирана с концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП и 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП на АЦФ с както и между концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП и 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП на АЦФ 43% ($p < 0,05$).

За да установим ефекта на пречистване на екстракта беше направено сравнение между експресиите на IL-1RN в групите, претретирани с еднакви концентрации от двата екстракта (ТЕ и АЦФ). Резултатите са представени в Таблица 30. Значимо повишение на експресията беше установено при концентрация от 5 и 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП съответно с 24% ($p < 0,05$) и с 92% ($p < 0,001$).

Таблица 30. Сравнение в генната експресия на IL-1RN в J774A.1 макрофази претретирани с ТЕ и АЦФ с еднакви концентрации на ТП.

	Концентрация на ТП [$\mu\text{g/mL}$]		
	5	15	135
Разлика в експресията на IL-1RN [%]	↑ 24%	↑ 92%	↓ 7%
p value	$p < 0,05$	$p < 0,001$	ns

(↑ - показва по-висока експресия в АЦФ; ↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ)

За да установим ефектът на билката върху експресията на IL-1RN в модела на LPS индуциран възпалителен отговор беше изчислен като процент от експресията на белтъка в групата клетки третиран с LPS и са представени в Таблица 31.

Таблица 31. Разлики в генната експресия на IL-1RN в проценти между претретирани с екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* J774A.1 в макрофази и такива, третиран с LPS.

Вид екстракт	ТЕ		АЦФ	
	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS
5	↓ 48%	$p < 0,001$	↑ 36%	$p < 0,01$

15	↓ 86%	p<0,01	↑ 41%	p<0,05
135	↓ 59%	p<0,01	↓ 63%	p<0,05

(↑ - показва по-висока експресия спрямо LPS; ↓ - по-ниска експресия спрямо LPS)

Всички концентрации от ТЕ понижават значимо стимулиращия ефект на LPS върху експресията на IL-1RN, както и високата концентрация от АЦФ.

Влияние върху транскрипционните нива на MCP-1

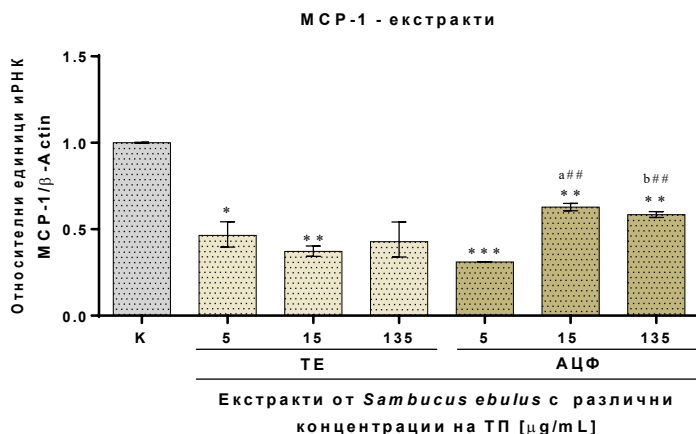
Експресия на MCP-1 в нестимулирани J774A.1 макрофаги

Моноцитен хемоатрактантен протеин-1 (MCP-1 или CCL2) е един от ключовите хемокини, които регулират миграцията и инфилтрацията на моноцити и макрофаги. Миграцията на моноцити от кръвния поток през васкуларния ендотел е необходима за рутинно имунологично наблюдение на тъканите, както и в отговор на възпаление.

Експресията на MCP-1 в нестимулирани J774A.1 макрофаги беше значително понижена при третирането с ТЕ от плодове на *Sambucus ebulus* (фиг. 23).

И трите приложени концентрации понижават експресията на MCP-1 с повече от 50%. Статистическа значимост беше установена при двете ниски концентрации, съответно ТЕ с концентрация от 5 µg/mL ТП понижава експресията с 54% (p<0,05), а концентрация от 15 µg/mL ТП - с 67% (p<0,01) спрямо нетретираната контролна група клетки. Не бяха установени значими разлики в експресията на MCP-1 при сравнение на ефекта на различни концентрации от ТЕ.

В групите, третирани с АЦФ, най-ниската концентрация от 5 µg/mL ТП доведе до най-силно понижение на експресията на MCP-1 от всички приложени концентрации на ТЕ и АЦФ с 69% (p<0,001). Следващите по-високи концентрации също сигнификантно понижават експресията съответно с 37% (p<0,01) за концентрация от 15 µg/mL ТП и с 42% (p<0,01) за концентрация от 135 µg/mL ТП спрямо нетретираната контролна група клетки.



Фигура 23. Влияние на екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* върху експресията МСР-1 в нестимулирани J774A.1 макрофаги, третираны с нарастващи концентрации от ТЕ и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група клетки.

* $p < 0,05$ спрямо К; ** $p < 0,01$ спрямо К; *** $p < 0,001$ спрямо К; a## $p < 0,01$ спрямо АЦФ 5; b## $p < 0,01$ спрямо АЦФ 5.

Направеният сравнителен анализ между експресиите на МСР-1 в групите клетки, третираны с различни концентрации от АЦФ установи значима разлика между ефекта на ниската концентрация от 5 μg/mL ТП и останалите две концентрации, съответно с 32% ($p < 0,01$) за концентрация от 15 μg/mL ТП и с 27% ($p < 0,01$) за концентрация от 135 μg/mL ТП.

С цел да установим влиянието на фракционирането върху ефекта на екстракта беше направено сравнение между експресията на МСР-при клетки, третираны с еднакви концентрации от двата вида екстракт. Разликите в експресията са израени в проценти и са представени в Таблица 32. Значимо по-висока експресия с 26% ($p < 0,05$) беше установена в клетките, третираны с концентрация от 15 μg/mL ТП на АЦФ, в сравнени със същата концентрация от ТЕ.

Таблица 32. Сравнение в генната експресия на МСР-1 в J774A.1 макрофаги третиран с еднакви концентрации от ТЕ и АЦФ.

	Концентрация на ТП [$\mu\text{g}/\text{mL}$]		
	5	15	135
Разлика в експресията на МСР-1 [%]	↓ 15%	↑ 26%	↑ 15%
p value	ns	p<0,05	ns

(↑ - показва по-висока експресия в АЦФ; ↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ)

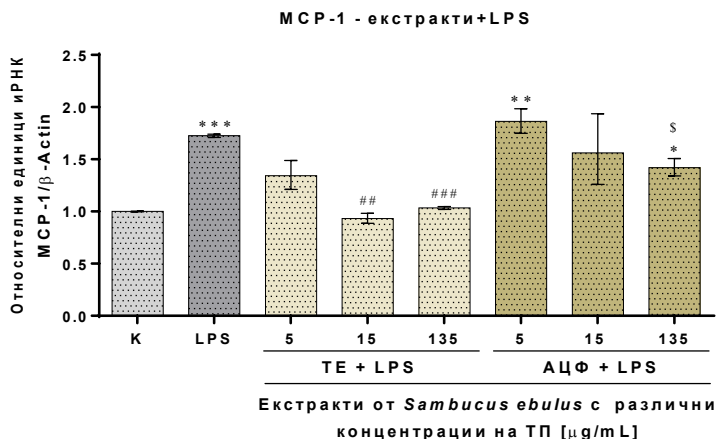
Експресия на МСР-1 в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги

В условията на LPS индуциран възпалителен отговор нивата на генна експресия в групата клетки, третиран с LPS беше установено значимо завишена експресия със 72% ($p<0,001$) спрямо нетретираната контролна група (фиг. 37). След претретиране на клетките с ТЕ и с последващо стимулиране с LPS, измерените транскрипционни нива на гена за МСР-1 спрямо групата, третирана с LPS бяха понижени. В клетките, претретиран с концентрации от 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП и 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП, беше установена значимо по-ниска експресия на МСР-1 спрямо групата, третирана с LPS съответно със 79% ($p<0,01$) и със 70% ($p<0,01$), като измерените транскрипционни нива достигнаха тези на нетретираната контролна група. Не беше установена значимост при сравнение на експресията между различните концентрации на ТЕ.

При макрофагите, претретиран с най-ниската приложена концентрация от АЦФ от 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП беше установено значимо повишение на експресията спрямо контролната групата с 86% ($p<0,01$), което надвишава нивата на експресия и на групата, третирана с LPS. Останалите две приложени концентрации също повишават експресията спрямо нетретираната контрола, като значимост беше установена в групата макрофаги, претретиран с концентрация от 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП с 42% ($p<0,05$).

При направеното сравнение между транскрипционните нива в групите, третиран с различни концентрации от АЦФ беше установено значително по-ниско ниво на експресия в клетките, претретиран с

концентрация от 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП спрямо клетките, претретиран с концентрация от 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП разлика от 44% ($p < 0,05$).



Фигура 24. Влияние екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* върху експресията на МСР-1 в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги, претретиран с нарастващи концентрации от ТЕ и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група клетки.

* $p < 0,05$ спрямо К; ** $p < 0,01$ спрямо К; *** $p < 0,001$ спрямо К; ## $p < 0,01$ спрямо LPS; ### $p < 0,001$ спрямо LPS; \$ $p < 0,05$ спрямо АЦФ+LPS 5.

При сравняване на нивата на иРНК на МСР-1 при макрофагите, претретиран с еднакви концентрации от двата екстракта бяха установени по-високи стойности и при трите приложени концентрации в групите, претретиран с АЦФ, спрямо тези, претретиран с ТЕ. Резултатите в проценти са представени в Таблица 34.

Таблица 34. Сравнение в нивата на генна експресия на МСР-1 в J774A.1 макрофаги претретиран с ТЕ и АЦФ с еднакви концентрации на ТП.

	Концентрация на ТП [$\mu\text{g}/\text{mL}$]		
	5	15	135
Разлика в експресията на МСР-1 [%]	↑ 52%	↑ 63%	↑ 39%
p value	ns	ns	$p < 0,05$

(↑ - показва по-висока експресия в АЦФ; ↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ)

Значимо по-висока стойност в експресията на MCP-1 беше установена при високата концентрация от 135 µg/mL ТП от АЦФ спрямо същата концентрация от ТЕ с 39% ($p < 0,05$).

За да установим ефектът на билката върху експресията на MCP-1 в модела на LPS индуциран възпалителен отговор беше изчислен като процент от експресията на белтъка в групата клетки третирани с LPS и са представени в Таблица 35. Значимо по-ниски нива на експресия на MCP-1, сравнени с групата третирана с LPS беше установено при третиране с концентрации от 15 и 135 µg/mL ТП от ТЕ съответно с 46% ($p < 0,01$) и с 40% ($p < 0,001$).

Таблица 35. Разлики в генната експресия на MCP-1 в проценти между претретирани с екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* J774A.1 макрофаги и такива третирани с LPS.

Вид екстракт	ТЕ		АЦФ		
	Съдържание на ПФ в хранителната среда (µg/mL)	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS
5		↓ 22%	ns	↑ 8%	ns
15		↓ 46%	$p < 0,01$	↓ 26%	ns
135		↓ 40%	$p < 0,001$	↓ 18%	ns

(↑ - показва по-висока експресия спрямо LPS; ↓ - по-ниска експресия спрямо LPS)

Влияние върху транскрипционните нива на COX-2

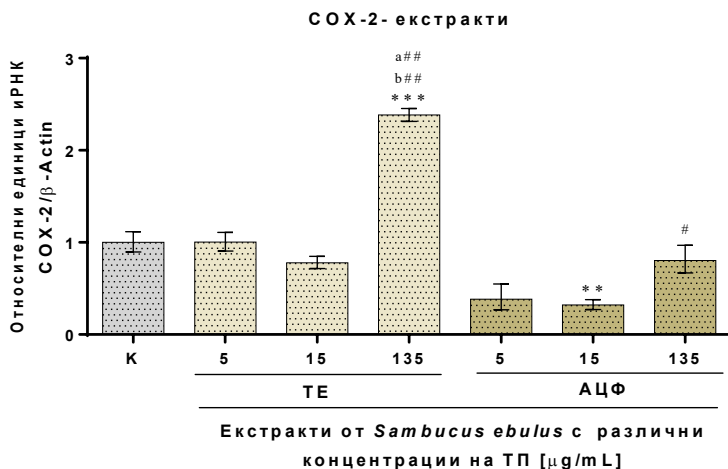
Експресия на COX-2 в нестимулирани J774A.1 макрофаги

Прилагането на ТЕ и АЦФ в нестимулирани J774A.1 макрофаги доведе до промяна в различна посока на експресията на COX-2 (фиг.25). Ниските концентрации (5 и 15µg/mL ТП) от ТЕ не доведоха до

промяна в експресията спрямо нетретираната контролна група. В клетките, третирани с концентрация от 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП беше наблюдаван различен ефект, който доведе до стимулиране на експресията със 138% ($p < 0,001$) спрямо контролата.

Сравнението на ефекта на различните концентрации от ТЕ установи значимо по-високи нива на експресията в групата, третирана с концентрация от 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП спрямо концентрации от 5 и 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП, съответно с 138% ($p < 0,01$) и с 160% ($p < 0,01$).

И трите приложени концентрации от АЦФ понижават експресията на СОХ-2. Сигнификантно понижение спрямо контролната група беше установено при концентрация от 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП с 68% ($p < 0,01$). Значимо по-висока експресия беше установена в клетките, третирани с АЦФ с концентрация от 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП спрямо клетките, третирани с концентрация от 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП с 42% ($p < 0,05$).



Фигура 25. Влияние на екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* върху експресията СОХ-2 в нестимулирани J774A.1 макрофаги, третирани с нарастващи концентрации от ТЕ и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група клетки.

p<0,01 спрямо К; *p<0,001 спрямо К; #p<0,05 спрямо АЦФ+LPS 15; a##p<0,01 спрямо ТЕ 5; b##p<0,01 спрямо ТЕ 15.

С цел да установим влиянието на фракционирането върху ефекта на екстракта беше направено сравнение между експресията на COX-2 при клетки, третирани с еднакви концентрации от двата вида екстракт. Разликите в експресията са изразени в проценти и са представени в Таблица 36. Статистически значимо по-ниска експресия беше установена при третиране с АЦФ с концентрации от 15 µg/mL ТП с 46% (p<0,05) и при концентрация от 135 µg/mL ТП с 158% (p<0,05).

Таблица 36. Сравнение в нивата на генна експресия на COX-2 в J774A.1 макрофаги третирани с еднакви концентрации от ТЕ и АЦФ.

Разлика в експресията на COX-2 [%]	Концентрация на ТП [µg/mL]		
	5	15	135
Разлика в експресията на COX-2 [%]	↓ 62%	↓ 46%	↓ 158%
p value	ns	p<0,05	p<0,05

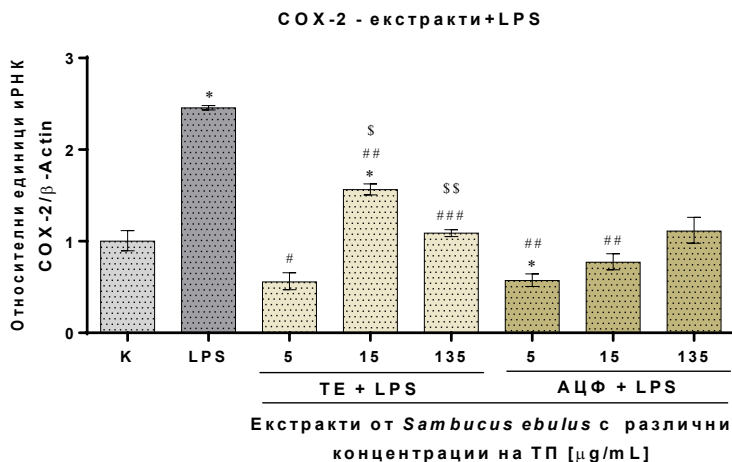
(↑ - показва по-висока експресия в АЦФ; ↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ)

Експресия на COX-2 в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги

В условията на LPS стимулиране стойността на експресията на COX-2 надвиши експресията на нетретираната контролна група с 146% (p<0,05). Стимулиращото действие на LPS беше инхибирано при претретиране на клетките с ТЕ и АЦФ за 24 часа. При измерване нивата на експресия на COX-2 при прилагане на LPS беше установена по-ниска експресия на гена в претретираниите клетки (фиг. 26).

При клетките претретирани с концентрация от 5 µg/mL ТП от ТЕ беше установен по-слаб стимулиращ ефект на LPS със 190% (p<0,05), като достигна стойности по-ниски от експресията на нетретираната контрола. При концентрация от 15 µg/mL ТП експресията беше значимо по-висока от тази на нетретираната контрола с 56% (p<0,05), но също така сигнификантно по-ниска спрямо клетките, третирани с LPS. Статистически значимо понижение се наблюдаваше и при концентрация от 135 µg/mL ТП с 137% (p<0,001) спрямо групата,

третирана с LPS. Значима разлика в експресията беше наблюдавана при сравнение между ефекта на концентрации от 5 и 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП от ТЕ със 100% ($p < 0,05$) и между концентрациите от 15 и 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП с 46% ($p < 0,01$).



Фигура 26. Влияние на екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* върху експресията на COX-2 в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги, претретирани с нарастващи концентрации от ТЕ и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група клетки.

* $p < 0,05$ спрямо К; # $p < 0,05$ спрямо LPS; ## $p < 0,01$ спрямо LPS; ### $p < 0,001$ спрямо LPS; \$ $p < 0,05$ спрямо ТЕ+LPS 5; \$\$ $p < 0,01$ спрямо ТЕ+LPS 15.

В групите макрофаги, претретирани с АЦФ в избраните концентрации беше установена промяна в нивата на генната експресия, зависима от приложената концентрация. Ниската концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП най-силно понижава експресията на ензима спрямо клетките, третирани с LPS с 189% ($p < 0,01$), като достига стойности значимо пониски от тези на нетретираната контрола с 43% ($p < 0,05$). Сигнификантно понижение беше наблюдавано и при клетките, претретирани с концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП спрямо групата, третирана с LPS с 169% ($p < 0,01$). При сравняване на нивата на иРНК на COX-2 при макрофагите, претретирани с еднакви концентрации от

двата екстракта бяха установени значимо по-ниски нива на генната експресия на COX-2 в макрофагите, претретиран с концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП от АЦФ спрямо същата концентрация от ТЕ с 79% ($p < 0,05$). Резултатите в проценти са представени в Таблица 37.

Таблица 37. Сравнение в нивата на генна експресия на COX-2 в J774A.1 макрофаги претретиран с ТЕ и АЦФ с еднакви концентрации на ТП.

	Концентрация на ТП [$\mu\text{g/mL}$]		
	5	15	135
Разлика в експресията на COX-2 [%]	↑ 2%	↓ 79%	↑ 3%
p value	ns	$p < 0,05$	ns

(↑ - показва по-висока експресия в АЦФ; ↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ)

За да установим ефектът на билката върху експресията на COX-2 в модела на LPS индуциран възпалителен отговор беше изчислен като процент от експресията на белтъка в групата клетки третиран с LPS и са представени в Таблица 38. Всички приложени концентрации от ТЕ и АЦФ значимо понижават експресията на белтъка спрямо клетките, третиран с LPS с изключение на групата, претретирана с концентрация от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП от АЦФ.

Таблица 38. Разлики в генната експресия на COX-2 в проценти между претретиран с екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* J774A.1 макрофаги и такива, третиран с LPS.

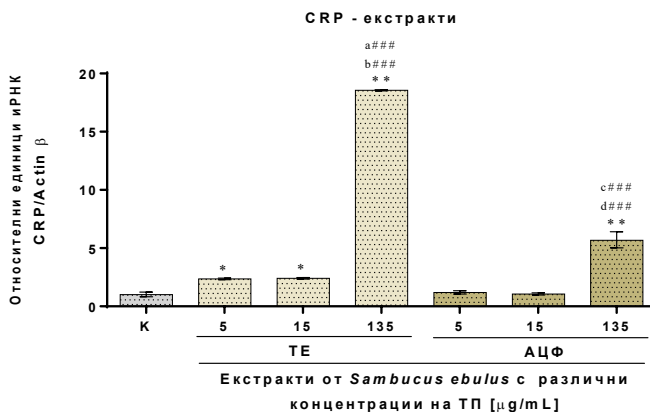
Вид екстракт	ТЕ		АЦФ	
	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS
5	↓ 77%	$p < 0,05$	↓ 77%	$p < 0,01$
15	↓ 36%	$p < 0,01$	↓ 69%	$p < 0,01$
135	↓ 56%	$p < 0,001$	↓ 55%	ns

(↑ - показва по-висока експресия спрямо LPS; ↓ - по-ниска експресия спрямо LPS)

Влияние върху транскрипционните нива на CRP

Експресия на CRP в нестимулирани J774A.1 макрофаги

В нестимулирани клетки ниските концентрации от ТЕ (5 и 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП) стимулират експресията на гена за CRP приблизително със 140% ($p < 0,05$), което е значително по-ниско от високата концентрация от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП, където стимулирането е с повече от 17 пъти ($p < 0,01$) спрямо нетретираната контролна група. Сравнението между ефекта на различните концентрации от ТЕ установи статистически значимо по-висока експресия при макрофагите, третирани с концентрация от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП спрямо концентрации от 5 и 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП ($p < 0,001$).



Фигура 27. Влияние на екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* върху експресията CRP в нестимулирани J774A.1 макрофаги, третирани с наратсващи концентрации от ТЕ и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група клетки.

* $p < 0,05$ спрямо К; ** $p < 0,01$ спрямо К; a### $p < 0,001$ спрямо ТЕ 5; b### $p < 0,001$ спрямо ТЕ 15; c### $p < 0,001$ спрямо АЦФ 5; d### $p < 0,001$ спрямо АЦФ 15.

При групите третирани с АЦФ в двете ниски концентрации от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП и 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП експресията почти не се отклонява от тази на нетретираната контрола, а високата концентрация стимулира експресията на CRP с 550% ($p < 0,01$), спрямо нетретираната контрола.

Сравнението между нивата на иРНК за CRP в клетките, третирани с концентрация от 135 µg/mL ТП от АЦФ и останалите две по-ниски концентрации (5 и 15 µg/mL ТП) от същата фракция, показва сигнификантно по-висока експресия ($p < 0,001$) при концентрация от 135 µg/mL ТП.

С цел да установим влиянието на фракционирането върху ефекта на екстракта беше направено сравнение между експресията на CRP при клетки, третирани с еднакви концентрации от двата вида екстракт. Разликите в експресията са изразени в проценти и са представени в Таблица 38. И трите приложени концентрации на ТЕ показват значимо по-силен ефект върху експресията на CRP спрямо тези на АЦФ.

Таблица 38. Сравнение в нивата на генна експресия на CRP в J774A.1 макрофаги третирани с еднакви концентрации от ТЕ и АЦФ.

	Концентрация на ТП [µg/mL]		
	5	15	135
Разлика в експресията на CRP [%]	↓ 117%	↓ 136%	↓ 1287%
p value	$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,05$

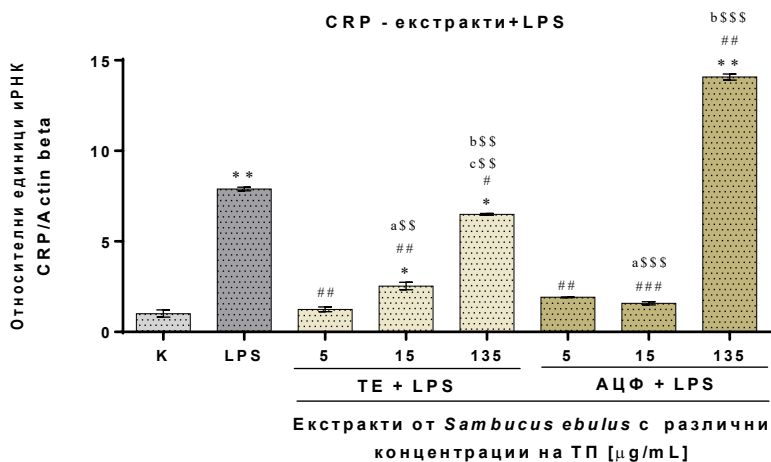
(↑ - показва по-висока експресия в АЦФ; ↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ)

Експресия на CRP в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги

LPS стимулирането на макрофагите доведе до стимулиране на транскрипцията на гена за CRP с 689% ($p < 0,01$) спрямо нетретираната контролна група.

Претретрирането на J774A.1 макрофаги с ТЕ и следващо стимулиране с LPS доведе до зависимо от приложената концентрация на ТП понижение на експресията при групите клетки претретирани с ТЕ. Концентрация от 5 µg/mL ТП в най-висока степен понижава експресията на CRP с 665% ($p < 0,01$), като нивата на иРНК в тази група не се различават от тази в нетретираната контрола. При макрофагите, претретирани с концентрация от 15 µg/mL ТП понижението на експресията е с 536% ($p < 0,01$) спрямо групата, третирана с LPS и значимо по-висока от тази на нетретираната контрола – 153% ($p < 0,05$).

Високата концентрация (135 $\mu\text{g/mL}$ ТП) в най-ниска степен потиска стимулиращият ефект на LPS върху експресията на CRP с 139% ($p < 0,05$). В тази група нивата на иРНК за CRP остават значимо по-високи спрямо тези на нетретирания контрол с 550% ($p < 0,05$).



Фигура 28. Влияние на екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* върху експресията на COX-2 в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги, претретирани с нарастващи концентрации от ТЕ и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група клетки

* $p < 0,05$ спрямо К; ** $p < 0,01$ спрямо К; # $p < 0,05$ спрямо LPS; ## $p < 0,01$ спрямо LPS; \$\$\$ $p < 0,001$ спрямо LPS; a\$\$\$\$ $p < 0,01$ спрямо TE+LPS 5; b\$\$\$\$ $p < 0,01$ спрямо TE+LPS 5; c\$\$\$\$ $p < 0,01$ спрямо TE+LPS 15; a\$\$\$\$\$ $p < 0,001$ спрямо АЦФ+LPS 5; b\$\$\$\$\$ $p < 0,001$ спрямо АЦФ+LPS 15.

Статически значима разлика в експресиите беше отчетена между групите, третирани с ниската концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП на ТЕ и с двете по-високи концентрации (15 и 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП) съответно със 129% ($p < 0,01$) и с 526% ($p < 0,01$). Същата значимост беше установена и при сравнението между ефекта на концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП и 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП – с 397% ($p < 0,01$).

В групите претретирани с АЦФ двете ниски концентрации понижиха експресията на CRP спрямо групата, третирана с LPS съответно с 589% ($p < 0,01$) за концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП и с 631%

($p < 0,001$) за концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП и нивата на иРНК в тези групи от тези в контролната група. При високата концентрация на АЦФ от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП експресията на CRP беше двукратно завишена спрямо групата, третирана с LPS ($p < 0,01$).

Сравнението между експресионните нива в клетките, претретиран с различни концентрации от АЦФ установи значимо по-висока стойност в макрофагите, претретиран с концентрация от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП спрямо тези, претретиран с концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП ($p < 0,001$) и концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП ($p < 0,001$).

При сравняване на нивата на иРНК на CRP при макрофагите, претретиран с еднакви концентрации от двата екстракта бяха установени различни ефекти, в групите макрофаги, претретиран с различна концентрация на ТП. При концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП АЦФ доведе до значимо по-ниска експресията ($p < 0,05$) спрямо същата концентрация от ТЕ (Таблица 39). Високата концентрация от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП на АЦФ сигнификантно повиши експресията ($p < 0,001$) на CRP спрямо същата концентрация от ТЕ.

Таблица 39. Сравнение в нивата на генна експресия на CRP в J774A.1 макрофаги претретиран с ТЕ и АЦФ с еднакви концентрации на ТП.

	Концентрация на ТП [$\mu\text{g/mL}$]		
	5	15	135
Разлика в експресията на CRP [%]	$\uparrow 67\%$	$\downarrow 95\%$	$\uparrow 751\%$
p value	ns	$p < 0,05$	$p < 0,001$

(\uparrow - показва по-висока експресия в АЦФ; \downarrow - показва по-ниска експресия в АЦФ)

За да установим ефектът на билката върху експресията на CRP в модела на LPS индуциран възпалителен отговор беше изчислен като процент от експресията на белтъка в групата клетки третиран с LPS и са представени в Таблица 40.

Таблица 40. Разлики в генната експресия на CRP в проценти между претретиран с екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* J774A.1 макрофаги и такива третиран с LPS.

Вид екстракт	ТЕ		АЦФ	
	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS
Съдържание на ПФ в хранителната среда ($\mu\text{g/mL}$)				
5	↓ 84%	$p < 0,01$	↓ 76%	ns
15	↓ 68%	$p < 0,01$	↓ 80%	$p < 0,001$
135	↓ 18%	$p < 0,01$	↑ 78%	$p < 0,001$

(↑ - показва по-висока експресия спрямо LPS; ↓ - по-ниска експресия спрямо LPS)

Всички приложени концентрации от ТЕ и АЦФ значимо понижават експресията на белтъка спрямо клетките, третирани с LPS с изключение на групата, претретирана с концентрация от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП от АЦФ, където експресията е завишена значимо, както спрямо нетретираната контрола, така и спрямо групата, третирана с LPS.

Влияние върху транскрипционните нива на iNOS

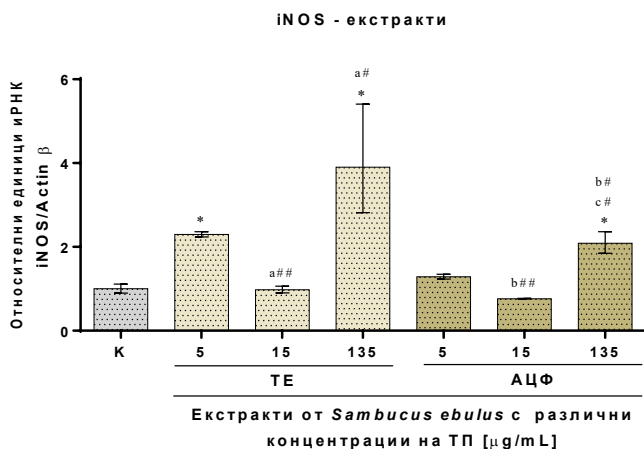
Експресия на iNOS в нестимулирани J774A.1 макрофаги

Генът за iNOS е известен като основен регулатор на продуцирането на NO в макрофагите (фиг. 29). Някои от приложените концентрации от ТЕ стимулираха експресията на ензима в различна степен, като максимално повишение беше наблюдавано при концентрация 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП с 290% ($p < 0,05$) спрямо нетретираната контролна група клетки. Сигнификантен стимулиращ експресията ефект беше установен и при ниската концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП със 130% ($p < 0,05$). Концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП не доведе до промяна в експресията на ензима спрямо нетретираната контролна група.

При направеното сравнение между ефекта на различните концентрации от ТЕ беше установено значимо по-ниска експресия в клетките, третирани с концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП със 132% ($p < 0,01$) спрямо клетките, третирани с концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП. Статистически значимо по-висока експресия беше установена в групата клетки, третирани с концентрация от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП спрямо тези, третирани с концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП с 160% ($p < 0,05$).

В групите клетки, третирани с приложените концентрации от АЦФ беше установена подобно на ТЕ тенденция в ефектите с по-ниски стойности на експресията. Високата концентрация от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП доведе до по-висока стойност на експресията на ензима спрямо контролната група със 108% ($p < 0,05$).

Установена беше значимо по-висока стойност на експресията на iNOS при макрофагите, третирани с концентрация от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП спрямо тези, третирани с двете по-ниски концентрации (5 и 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП) съответно със 79% ($p < 0,05$) и със 132% ($p < 0,05$). При третиране с концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП на АЦФ беше наблюдавано понижаване на експресията с 53% ($p < 0,01$) спрямо експресията в клетките, третирани с концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП.



Фигура 29. Влияние на екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* върху експресията CRP в нестимулирани J774A.1 макрофаги, третирани с нарастващи концентрации от ТЕ и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група клетки.

* $p < 0,05$ спрямо К; a# $p < 0,05$ спрямо ТЕ 15; b# $p < 0,05$ спрямо АЦФ 5; c# $p < 0,05$ спрямо АЦФ 15; a## $p < 0,01$ спрямо ТЕ 5; b## $p < 0,01$ спрямо АЦФ 5.

За да установим ефекта на пречистване на АЦФ върху експресията на ензима направихме сравнение между експресиите на

клетките, третирани с еднакви концентрации от ТЕ и АЦФ, което е изразено в проценти в таблица 41.

Таблица 41. Сравнение в нивата на генна експресия на iNOS в J774A.1 макрофаги третирани с еднакви концентрации от ТЕ и АЦФ.

Разлика в експресията на iNOS [%]	Концентрация на ТП [µg/mL]		
	5	15	135
p value	p<0.001	ns	ns

(↑ - показва по-висока експресия в АЦФ; ↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ)

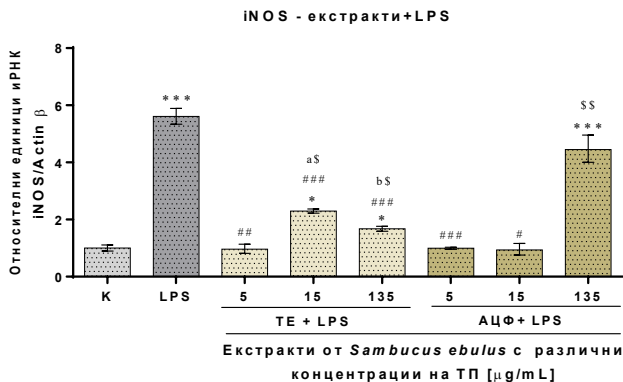
Всички приложени концентрации от АЦФ понижават експресията на ензима спрямо същите от ТЕ, като при концентрация от 5 µg/mL ТП беше установена висока сигнификантна разлика (p<0,001).

Експресия на iNOS в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги

При направения PCR анализ нивата на iNOS в клетките бяха значително повишени в групата третирана с LPS (100 ng/mL) с 460% (p<0,001) спрямо контролната група клетки.

Нивата на иРНК се намалява при претретиране на макрофагите с ТЕ, като при концентрация от 5 µg/mL ТП понижението е с 464% (p<0,01) и достига стойностите на експресията в нетретираната контрола. Значимо понижение на експресията спрямо клетките, третирани с LPS беше установено и при следващите две приложени концентрации от 15 и 135 µg/mL ТП - с 330% (p<0,001) и с 393% (p<0,001). При същите концентрации се установяват значимо по-високи нива на експресията на ензима спрямо нетретираната контрола (p<0,05).

Направеното сравнение между ефекта на приложените различни концентрации от ТЕ установи значимо по-висока експресия в клетките, претретирани с концентрация от 15 µg/mL ТП със 130% (p<0,05) спрямо експресията в клетките, претретирани с концентрация от 5 µg/mL ТП на същия екстракт. При сравнение между концентрация от 15 µg/mL ТП и 135 µg/mL ТП беше установено значимо по-ниско ниво на експресията в последната група клетки с 63% (p<0,05).



Фигура 30. Влияние на екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* върху експресията на iNOS в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги, претретирани с наратсващи концентрации от ТЕ и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група клетки

* $p < 0,05$ спрямо К; ** $p < 0,005$ спрямо К; # $p < 0,05$ спрямо LPS; ## $p < 0,01$ спрямо LPS; ### $p < 0,001$ спрямо LPS; а\$ $p < 0,05$ спрямо ТЕ+LPS 5; б\$ $p < 0,05$ спрямо ТЕ+LPS 15; \$ $p < 0,01$ спрямо АЦФ+LPS 15.

Двете от приложените концентрации от АЦФ (5 и 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП) доведоха до значимо по-ниски стойности на генната експресия на iNOS в сравнение с експресията в групата макрофаги, третирани с LPS, съответно с 460% ($p < 0,001$) и с 467% ($p < 0,05$). При концентрация от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП беше установена значимо по-висока експресия на ензима с 345% ($p < 0,001$) в сравнение с нетретираната контролна група клетки. Същата концентрация от АЦФ значимо повишава стойностите на генната експресия с 340% ($p < 0,01$) спрямо по-ниската концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП.

При сравняване на нивата на иРНК на iNOS при макрофагите, претретирани с еднакви концентрации от двата екстракта бяха установени различни ефекти, в групите макрофаги, претретирани с различна концентрация на ТП. Резултатите са изразени в проценти и са представени в таблица 50. Значимо по-ниска стойност на експресията в клетките, претретирани с АЦФ беше установена при концентрация от

15 $\mu\text{g/mL}$ ТП със 136% ($p < 0,05$). Обратен ефект беше установен при високата концентрация от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП, където експресията в клетките, претретиран с АЦФ беше значително по-висока с 278% ($p < 0,01$) спрямо ТЕ.

Таблица 42. Сравнение в нивата на генна експресия на *iNOS* в *J774A.1* макрофаги претретиран с ТЕ и АЦФ с еднакви концентрации на ТП.

	Концентрация на ТП [$\mu\text{g/mL}$]		
	5	15	135
Разлика в експресията на <i>iNOS</i> [%]	\uparrow 3%	\downarrow 136%	\uparrow 278%
p value	ns	$p < 0,05$	$p < 0,01$

(\uparrow - показва по-висока експресия в АЦФ; \downarrow - по-ниска експресия в АЦФ)

За да установим ефектът на билката върху експресията на *iNOS* в модела на LPS индуциран възпалителен отговор беше изчислен като процент от експресията на белтъка в групата клетки третиран с LPS и са представени в Таблица 43. Всички приложени концентрации, с изключение на концентрация от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП от АЦФ намаляват стимулиращото действие на LPS върху експресията на *iNOS*.

Таблица 43. Разлики в нивата на генна експресия на *iNOS* в проценти между претретиран с екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* *J774A.1* макрофаги и такива третиран с LPS.

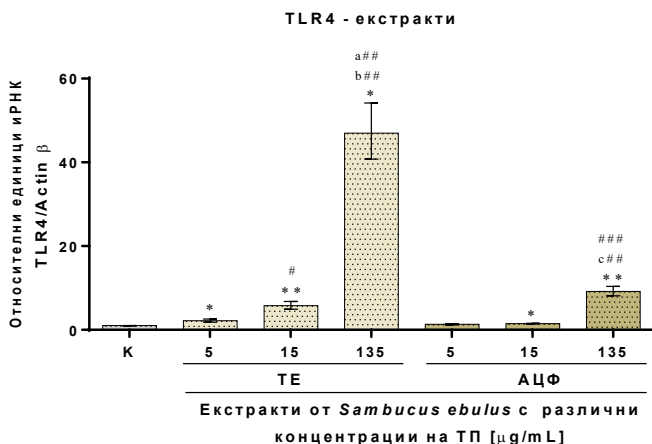
Вид екстракт	ТЕ		АЦФ	
	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS
5	\downarrow 83%	$p < 0,01$	\downarrow 82%	$p < 0,001$
15	\downarrow 59%	$p < 0,001$	\downarrow 83%	$p < 0,05$
135	\downarrow 70%	$p < 0,001$	\downarrow 21%	ns

(\uparrow - показва по-висока експресия спрямо LPS; \downarrow - по-ниска експресия спрямо LPS)

Влияние върху транскрипционните нива на TLR-4

Експресия на TLR-4 в нестимулирани J774A.1 макрофаги

TLR4 е трансмембранен протеин, чието активиране води до производство на провъзпалителни цитокини.



Фигура 31. Влияние на екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* върху експресията TLR-4 в нестимулирани J774A.1 макрофаги, третиран с нарастващи концентрации от ТЕ и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група клетки.

* $p < 0,05$ спрямо К; ** $p < 0,01$ спрямо К; # $p < 0,05$ спрямо ТЕ 5; a## $p < 0,01$ спрямо ТЕ 5; b## $p < 0,01$ спрямо ТЕ 15; c## $p < 0,01$ спрямо АЦФ 15; ### $p < 0,001$ спрямо АЦФ 5.

В групите клетки, третиран с ТЕ бяха установени по-високи стойности на експресионните нива, в зависимост от концентрацията на ТП в тях спрямо нетретираната контролна група клетки. Ниската концентрация от 5 µg/mL ТП повиши експресията със 116% ($p < 0,05$), следвано от концентрация от 15 µg/mL ТП, където отчетените стойности на експресията бяха по-високи от тези на контролата с 470% ($p < 0,01$). Резултатите от PCR анализа показаха, че в клетките, третиран с концентрация от 135 µg/mL ТП от ТЕ експресията е многократно по-висока от тази на нетретираната контролна група ($p < 0,05$).

При направеното сравнение между ефекта на различните, приложени концентрации от ТЕ беше установено значимо повишение на експресията в клетките, третирани с концентрация от 15 µg/mL ТП с 360% (p<0,05) спрямо концентрация от 5 µg/mL ТП. Значително по-високи стойности на експресията бяха установени и при концентрация от 135 µg/mL ТП спрямо останалите две по-ниски концентрации от ТЕ, съответно – с 45 пъти (p<0,01) спрямо концентрация от 5 µg/mL ТП и с 41 пъти (p<0,01) спрямо концентрация от 15 µg/mL ТП.

В групата макрофаги, третирани с АЦФ с концентрация от 15 µg/mL ТП беше наблюдавано сигнификантно по-висока с 50% (p<0,05) експресия спрямо контролната група. Концентрация от 135 µg/mL ТП значително повишава експресията на TLR4 с 800% (p<0,01) спрямо нетретирания контрол. Същата концентрация доведе до значимо по-високи стойности на експресията спрямо останалите две концентрации, съответно с над 800% (p<0,001) спрямо групата, третирана с концентрация от 5 µg/mL ТП и със 770% (p<0,01) спрямо групата, третирана с концентрация от 15 µg/mL ТП.

За да установим ефекта на пречистване на АЦФ върху експресията на ензима направихме сравнение между експресиите на клетките, третирани с еднакви концентрации от ТЕ и АЦФ, което е изразено в проценти в Таблица 45. Значимо по-ниски стойности на експресията на TLR4 бяха установени при макрофагите, третирани с АЦФ с концентрации от 15 и 135 µg/mL ТП спрямо тези третирани със същите концентрации от ТЕ.

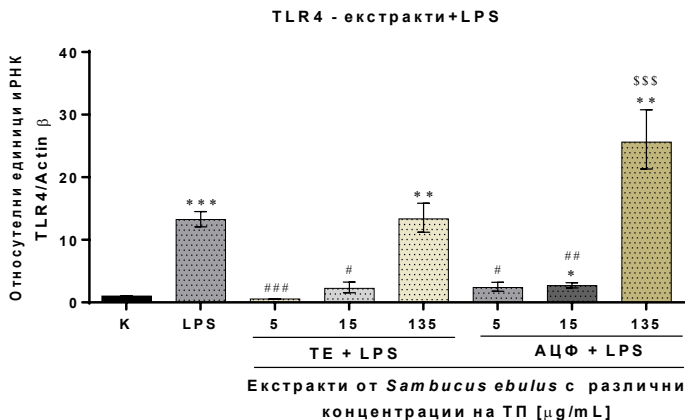
Таблица 45. Сравнение в нивата на генна експресия на TLR4 в J774A.1 макрофаги третирани с еднакви концентрации от ТЕ и АЦФ.

	Концентрация на ТП [µg/mL]		
	5	15	135
Разлика в експресията на TLR4 [%]	↓ 85%	↓ 430%	↓ 3790%
p value	ns	p<0,01	p<0,05

(↑ - показва по-висока експресия в АЦФ; ↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ)

Експресия на TLR-4 в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги

При симулиране на макрофагите с LPS бяха измерени значимо по-високи стойности на експресията с 1200% ($p < 0,001$) спрямо нетретрираната контрола (фиг. 45).



Фигура 33. Влияние на екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* върху експресията на TLR-4 в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги, претретирани с нарастващи концентрации от ТЕ и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група клетки

* $p < 0,05$ спрямо К; ** $p < 0,01$ спрямо К; *** $p < 0,001$ спрямо К; # $p < 0,05$ спрямо LPS; ## $p < 0,01$ спрямо LPS; ### $p < 0,001$ спрямо LPS; \$\$\$ $p < 0,001$ спрямо АЦФ+LPS 15.

Претретрирането с ТЕ с концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП понижи значимо експресията на TLR-4 спрямо групата, стимулирана с LPS до стойности по-ниски от тези на нетретрираната контрола ($p < 0,001$). Значимо по-ниска експресия с 1000% ($p < 0,05$) спрямо групата, третирана с LPS беше установена и при клетките, претретирани с концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП.

В макрофагите, претретирани с АЦФ се установи значимо понижение на експресионните нива на TLR-4 в двете ниски концентрации от 5 и 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП с повече от 1000% ($p < 0,01$). При сравнение на ефекта на различните концентрации от АЦФ беше установена сигнификантно по-висока стойност на експресията в групата, претретрирана с концентрация от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП, спрямо

групата, претретирана с концентрация от 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП с 2300% ($p < 0,001$).

При сравняване на нивата на иРНК на TLR-4 при макрофагите, претретирани с еднакви концентрации от двата екстракта не бяха установени значими разлики в експресията на белтъка. Резултатите са изразени в проценти и са представени в таблица 44.

Таблица 44. Сравнение в нивата на генна експресия на TLR-4 в J774A.1 макрофаги претретирани с ТЕ и АЦФ с еднакви концентрации на ТП.

	Концентрация на ТП [$\mu\text{g}/\text{mL}$]		
	5	15	135
Разлика в експресията на TLR-4 [%]	↑ 183%	↑ 45%	↑ 1229%
p value	ns	ns	ns

(↑ - показва по-висока експресия в АЦФ; ↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ)

За да установим ефектът на билката върху експресията на TLR-4 в модела на LPS индуциран възпалителен отговор беше изчислен като процент от експресията на белтъка в групата клетки третирани с LPS и са представени в Таблица 45.

Таблица 45. Разлики в генната експресия на TLR-4 в проценти между претретирани с екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* J774A.1 макрофаги и такива третирани с LPS.

Вид екстракт	ТЕ		АЦФ	
	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS
5	↓ 9%	$p < 0,01$	↓ 82%	$p < 0,001$
15	↓ 59%	$p < 0,001$	↓ 83%	$p < 0,05$
135	↓ 70%	$p < 0,001$	↓ 21%	ns

(↑ - показва по-висока експресия спрямо LPS; ↓ - по-ниска експресия спрямо LPS)

Всички приложени концентрации от ТЕ и АЦФ с изключение на концентрация от 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП за АЦФ водят до сигнификантно понижение на стимулиращия ефект на LPS върху експресията на белтъка.

Обсъждане

Възпалението е имунологичен защитен механизъм, чрез който организмът отговаря на увреждане или инфекция, като изпраща в съответните места клетки на имунната система, които унищожават чужди за организма мъртви и/или умиращи собствени клетки.

Координирането на действията на отделните типове имунни клетки, участници в контрола на възпалението, се осъществява чрез сигнални молекули. Секрецията на възпалителни медиатори, като хистамин, левкотриен, PGE2, брадикинин, система на комплемента, тромбин и т.н., води до съдови изменения, включително повишена пропускливост, вазодилатация и забавяне на кръвния поток, като резултатът е набиране и екстравазация на левкоцити. Възпалението се характеризира с увеличени плазмени нива на някои възпалителни фактори, такива като TNF- α , IL-6, MCP-1 и други.

Възпалителните реакции са свързани с повишено продуциране на NO, PGE2 и възпалителни цитокини, такива като IL-6 и TNF- α (Fujiwara et. al., 2005). TNF- α участва в производството на многобройни цитокини и протеини в острата фаза на възпалението, допринасящи за много патолофизиологични процеси (Liu et al., 2005). IL-6 е важен медиатор на треска и е основен цитокин от острата фаза на възпалението, който инициира вродената мунна система в отговор на инфекция (Singh et al., 2013). Цитокина не само действа като индуктор на реакции от острата фаза, но също така играе важна роля в хроничното възпаление (Gabay, 2006).

Макрофагите играят важна роля във вродените и адаптивни имунни отговори чрез освобождаване на различни фактори, като провъзпалителни цитокини, кислородни форми, азотни съединения. Възпалителните реакции са серия от добре координирани събития,

които се контролират от няколко фактора, включително цитокини, ензими и вазоактивни медиатори (Hassimoto et al., 2013).

Третирането с LPS индуцира генната експресия като повишава и цитозолните белтъчни нива на цитокини (IL-1 β и IL-6) и на провъзпалителни ензими (iNOS), чрез активиране на NF- κ B транскрипционният фактор (Tan et al., 2006; Kim et al., 2009; Maraslioglu et al., 2014). TLR4 активира транслокацията на NF- κ B и AP-1 към ядрото, последвано от свързване с елементи за регулиране на възпалението цитокини и молекули, включително TNF- α , IL-6, NO и ейкозаноиди.

LPS може да активира няколко извънклетъчни сигнални пътища, включително NF- κ B и MAPKs (Lu et al., 2012; Lawrence et al., 2009). NF- κ B е ключов транскрипционен регулатор на възпалителния отговор и играе важна роля в развитието на възпалителния процес и клетъчните увреждания. Той се активира в отговор на различни извънклетъчни стимули, включващи оксидативен стрес, LPS и цитокини (Park et al., 2005; Lawrence et al., 2009; Park et al., 2011). TLR4 пътя в макрофаги е ключов при проучване на потенциалните свойства на множество фитохимикали, проявяващи противовъзпалителни свойства (Jacobs et al., 2001).

В потвърждение на изложените на фигура 46 механизми беше и полученият от нас резултат, при третиране с LPS, при който повлияването на експресията на TLR4, IL-6, TNF- α , както и на индуцируемите iNOS и COX-2 беше очаквано по-висок в сравнение в нетретираната контролна група клетки. Следователно, инхибирането на този път може да бъде възможен механизъм на противовъзпалителното ефекти на екстракти от *Sambucus ebulus*. Много от фенолните компоненти, съдържащи се във водни и етанолови екстракти от *Sambucus ebulus*, работа на предишни изследвания на част от екипа показват инхибиране на NF- κ B транскрипцията.

Ползите за здравето на плодовете са свързани с високото съдържание на полифеноли в тях. (Chun et al., 2007). По-специално, антоцианините от плодовете са известни със своя силен антиоксидантен

и противовъзпалителен ефект (Schauss et al., 2006; Miguel et al., 2011). Въпреки, че противовъзпалителните ефекти на антоцианините са свързани с техния антиоксидантен потенциал, липсват доказателства за ефектите на антоцианини, извлечени от плодове на *Sambucus ebulus* това при *in vitro* изследване в макрофаги. В това изследване ние потърсихме доказателства дали на антоцианините от замразени плодове на бязак проявяват противовъзпалителни ефекти, както и антиоксидантни свойства.

Установено е, че някои полифеноли, като елагова киселина могат да намалят експресията на провъзпалителните цитокини (TNF- α , IL-1 β и IL-6) на нивото на иРНК и протеини и да регулират експресията на iNOS и COX-2, което на свой ред намалява NO и PGE2 (Lin Du et al. 2018). В изследване на афекта на антоцианините получени от моркови при възпаление резултатите показват, че екстрактите регулират експресията на иРНК на провъзпалителни интерлевкини IL-1 β (91%) и IL-6 (69%), както и възпалителни медиатори, като циклооксигеназа-2 (COX-2) и индуцируема синтаза на азотен оксид (iNOS), в активирани с LPS RAW264.7 клетки. Установено е намаление в генерирането на простагландин E2 (48%) и азотния оксид (26%), което се наблюдава в резултат на инхибирането на COX-2 (25%) и iNOS (12%) експресии на иРНК (Anna Olejnik et al. 2016).

Екстракти, богати на полифеноли проявяват защитно действие срещу редица хронични заболявания. Предишни проучвания показват, че антоцианините като мощни антиоксиданти потискат апоптозата и инвазията на туморни клетки, предизвикани от оксидативния стрес (Shih et al., 2007; Zhang et al., 2005). Poulouse et al. (2012) показва, че предварително третиране на BV-2 микроглиални клетки с богат на антоцианини екстракт от акай бери проявява противовъзпалително действие, като намалява освобождаването на NO, продуциране на iNOS и експресия на COX-2. Различни проучвания потвърждават способността на различните флавоноиди за потискане на COX-2 на транскрипционно ниво, както е наблюдавано при генистеин и кемпферол в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги (Chi et al., 2005). Различните флавоноиди инхибират получаването на NO от активирани макрофаги

или клетки, подобни на макрофаги, както е показано от *in vitro* проучвания показващи, че кверцетин и апигенин могат ефективно да инхибират експресия на iNOS в клетъчната линия RAW 264.7 (Chi et al., 2005), а също така, че генистеин, изорамнетин, кемпферол, кверцетин, нарингенин и пеларгонидин могат да инхибират експресията iNOS, както и производство на NO дозозависимо в активираните макрофаги (Hamalainen et al., 2007). Някои автори твърдят, че ефектите на флавоноидите водят по-често до намаляване на експресията на iNOS, отколкото до понижаване на ензимната активност (Chen et al., 2001; Chi et al., 2005; Hamalainen et al., 2007), което е в потвърждение на полученият от нас резултата, при който беше отчетено статистически значимо инхибиране на експресията на iNOS ($p < 0,001$) и от екстракта, и от фракцията.

Полифенолите и в частност антоцианините инхибират експресията на iNOS и COX-2 в модел на индуцирано възпаление. Генът за iNOS е известен като основен регулатор на продуцирането на NO в макрофагите, а COX-2 се повишава при възпалителни реакции и злокачествени състояния (Linet al., 2013; Marletta, 1993). Производството на NO и простагландин E2 (PGE2) от макрофагите зависи от експресията на възпалителни медиатори, които се индуцират от възпалителни цитокини и LPS, и NO е от решаващо значение за елиминиране на вътреклетъчните патогени.

Фенолните съединения проявяват противовъзпалителни действия чрез промяна на натрупването на възпалителни клетки намалявайки производството на провъзпалителни молекули, като например TNF- α , IL-6 и CRP от ендотела, като по този начин потискат клетъчната миграция на моноцити в субендотелиално пространство (Tangney and Rasmussen, 2013). Тези цитокини са способни да задействат производството на АКФ, които служат като вторични посредници в различни клетки. Полифенолите могат да насърчават тяхното противовъзпалително действие чрез модулиране на транскрипционни мрежи или сигнални каскади, които модулират генната експресия и водят до инхибиране на възпалителните медиатори. В *in vitro* проучване епикатехин по-

тиска производство на провъзпалителни цитокини, IL-6 и IL-8, с едновременно увеличаване на експресията на противовъзпалителния цитокин IL-10 в култури от пълна кръв (Al-Hanbali et al., 2009). В друго проучване епигенин и кемпферол потискат експресията на LPS-индуциран IL-1 β . Всички тези полифеноли, включително и ресвератрол ефективно намалява LPS-индуцираната експресия на TNF- α в J774 макрофаги (Kowalski et al., 2005). Епикатехин също така намалява количеството на NF- κ B в цитоплазмените фракции (Al-Hanbali et al., 2009). Различни флавоноиди могат да потискат експресията на други провъзпалителни медиатори (Hou et al., 2005, López-Posadas et al., 2010). COX-2, важен участник във възпалителните отговори, се инхибира от два антоцианина, делфинидин и цианидин в LPS-активирани RAW264 клетки (Hou et al., 2005). Кемпферол също така потиска експресията на COX-2 и TNF- α в LPS третирани RAW264 клетки (Kim et al., 2015).

ТЕ и АЦФ от плодове на *Sambucus ebulus* самостоятелно индуцира слабо експресията на iNOS, COX-2 и TNF- α в J774A.1 макрофагите. Също така ТЕ индуцира значимо и зависимо от приложената концентрация на ТП експресията на IL-6, докато при АЦФ ефекта е значително по-слаб, което вероятно се дължи на видовото разнообразие от ПФ в ТЕ и синегричното им действие. Експресията на MCP-1 и антагониста на рецептора за IL-1 β (IL-1RN) в нестимулираните макрофаги се инхибира слабо, но значимо от АЦФ в сравнение с ТЕ, който инхибира в по-голяма степен експресията на тези два гена. За разлика от това експресията на самия IL-1 β е силно, статистически значимо понижена както от екстракта, така и от фракцията.

Тези резултати потвърждават приложението на плодовете на *Sambucus ebulus*, както във фармацията, така и в народната медицина като имуностимулиращо средство, в основата на което стои уминомодулиращото действие на плодовете, потвърдено от получените резултати, показващи слаба индукция на възпалителните белтъци.

В нашето проучване ние установихме, че LPS индуцира IL-6 и TNF- α секрецията от J774A.1 макрофагиалните клетки, докато нивата на секреция значително намаляват, когато клетките са претретирани с ТЕ и АЦФ от плодовете на бъзак.

Стимулирането на производството на провъзпалителните медиатори се осъществява чрез взаимодействието на LPS и TLR4, чиито стойности на експресията са значително понижени в условията на LPS стимулиране, предшествано от претретиране с билката. Инхибирането на TLR4 потиска NF- κ B и производството на възпалителни цитокини. Неконтролираното и прекомерно произвеждането на тези възпалителни медиатори причинява вредно въздействие. Следователно, може да се счита, че те от своя страна са мишени за противовъзпалителни агенти. Освен това, нивата на възпалителните медиатори са взаимно свързани помежду си. Някои проучвания сочат, че експресията на iNOS се стимулира от провъзпалителни цитокини, такива като IL-1 β и TNF- α , а също така, че IL-6 е предпоставка за увеличаване на производството на NO (Marcus et al., 2003; Schrader et al., 2007). Дефицитът или прекомерното производство на NO е белег на много заболявания (Alderton et al., 2001; Bogdan et al., 2001; Dawn et al., 2002). Индуцируемата азотен оксид синтаза (iNOS) е един от трите ключови ензима генериращи NO от аминокиселината аргинин. Ензимът опосредства неспецифичните механизми за защита, като играе критична роля при изчистването на бактерии, гъбични и паразитни инфекции (Aktan et al., 2004; Kroncke et al., 1998). Той може да се индуцира в различни типове клетки от бактериални LPS и цитокини, включително и интерферон, следователно инхибиране на активацията му може да окаже терапевтична полза в елиминиране на възпалението (Aktan et al., 2003).

В нашата работа претретирането на макрофагите с избраните концентрации от ТЕ и АЦФ намали нивото на тестваните възпалителни маркери (TNF- α , IL-1 β , IL-1RN, IL-6 и iNOS) спрямо групата третирана с LPS. Експресията на всички възпалителни протеини е значително повишена при третиране с LPS ($p < 0,05$; $p < 0,001$). В тази връзка ние изследвахме експресията на TLR4 като медиатор при активирането на MAPKs. От друга страна активирането на TLR4 води до генериране на АКФ от НАДФН осидазата (NOX), които от своя страна активират транслокацията на NF- κ B в ядрото с последващо активиране на експресията на COX-2 (Biswas et al., 2012; Kabe et al., 2005; Hsing et al., 2011). Понижената експресия на TLR4 под действие на екстрактите от една страна

може да потиска активирането на MAPKs и експресията на iNOS, намалява производството на АКФ и от друга страна инхибира активността на COX-2. Понижената експресия на COX-2 води до намаляване на производство на PGE2, което е свързано с възпалителният процес (Kalinski, 2012) чрез насърчаване на локалната вазодилатация и индукция на неутрофили, макрофаги и мастоцити в ранните стадии на възпаление (Wang and Lau, 2006). В подкрепа на нашите резултати са публикациите на други автори, например Gasparri et al. (2017) твърдят, че екстрактът от ягоди показва противовъзпалителен профил и този ефект се дължи на способността за намаляване на оксидативния стрес, включително производство на NO, индуцирано от LPS в необработени 264.7 макрофаги. Нашите резултати също са потвърдени от Wang et al. (2015), които разкриха важен инхибиторен ефект на антоцианините, изолирани от *Ligustrum fruit* на NO нива, при миши модели на едем на ухото (Wang et al., 2015). Това показват и резултатите на Vendrame, Kristo, Schuschke и Klimis-Zacas (2014) при плъхове със затлъстяване, подложени на диета от боровинки, които са източник на антоцианини, при които се наблюдава инхибиране на iNOS (Vendrame et al., 2014).

Противовъзпалителният ефект антоцианините се проявяват чрез различни механизми, включително инхибиране на NF- κ B транслокацията, AP-1, cAMP-свързан протеин (Miguel et al., 2011; Hou et al., 2005). Механизмите, чрез които антоцианините инхибират NF- κ B активирането не е напълно изяснен. Счита се, че един възможен механизъм е антоцианините, чрез техните продукти на разпадане или метаболити да служат като редокс буфери, способни да потискат оксидативния стрес и по този начин да възпрепятстват възпалителния отговор чрез директно почистване на АКФ. Тези събития може в крайна сметка да бъдат последвани от намалена секреция на провъзпалителни сигнални молекули и медиатори, както се наблюдава в нашето проучване.

За да покажем как екстракта и фракциите намаляват ефекта на възпаление, индуцирано от LPS, ние изследвахме експресията на iNOS и COX-2, два основни възпалителни медиатора, които забележимо намаляват под действие на претретрирането. Освен тях два проинфлама-

торни цитокина IL-1 β и IL-6 също понижават експресията си под действие на екстракта и фракциите. Ако за IL-6 и в ТЕ, и в АЦФ в еднаква степен понижиха експресията на белтъка без концентрацията да е определяща за това, то при IL-1 β се наблюдава интересна тенденция. Ниските концентрации от ТЕ и АЦФ в комбинация с LPS значително повишават експресията, а високите концентрации я понижават с почти 75% ($p < 0,05$), спрямо групата третирана с LPS. Вероятните механизми, по които антоцианините повлияват възпалителния ефект на LPS е чрез потискане на NF- κ B пътя или чрез намаляване на активността на AP-1 пътя, което е установено от други автори (Li1 et al., 2014). Хроничното възпаление често пъти е предвестник на туморни образувания. Свръхсекрецията на възпалителни фактори е критична за туморогенезата и в тази връзка някои автори съобщават, че антоцианините, контролирайки експресия на възпалителни фактори упражняват противовъзпалителната си функция (Esposito et al., 2014; Peiffer et al., 2014). Например цианидин-3-глюкозид и делфинидин-3-глюкозид инхибират активирането на NF- κ B, активирано от външни стимули, като LPS или IFN- γ , чрез действие върху PI3K/PKB и MAPK пътища, като инхибират експресията на COX-2 и iNOS, респективно и производството на техните продукти PGE2 и NO (Limtrakul et al., 2015; Haseeb et al., 2013; Jeong et al., 2013; Peiffer et al., 2014).

Антоцианините блокират LPS индуцираното фосфорилиране на I κ B α , което води до намляване на фосфорилирания, активен p65 и транслокацията му в ядрото. Антоцианините инхибират също и фосфорилирането на JNK, но не и на p38 (Li1 et al., 2014). Което ни дава основание да се заключи, че противовъзпалителният отговор на антоцианините е медиран предимно чрез потискане на IKK, I κ B α и JNK, като по този начин потискат експресията на провъзпалителните гени, като iNOS, COX-2, IL-1 β и IL-6. При изследване на биологичната активност на полифеноли, изолирани от къпина и касис в модел на LPS индуцирано възпаление при моноцити е установено, че полифенолите инхибират NF- κ B (Karlsen et al., 2007). Хлорогенната киселина и производните на кверцетин са основни компоненти на екстракт от полифеноли в пипер от Тасмания. Този екстракт намалява LPS-индуцирания възпали-

телни реакции в RAW 264.7 клетки. Shan et al., 2009, съобщават, че хлорогеновата киселина намалява LPS-индуцирана експресия на COX-2 в RAW 264.7 клетки, което води до инхибиране на PGE2. Авторите показва, че хлорогенната киселина значително подтиска LPS-индуцирано активиране на ядрен фактор-kABB (NF-kB) и път на c-Jun N-крайна киназа (JNK) -c-Jun-активатор протеин (AP-1) (Shan et al., 2009). По подобен начин, хлорогенната киселина и производни на кверцетин, изолирани от круша, *Rosa laevigata* Michx, *Tithonia diversifolia* и орлови нокти (*Lonicera caerulea* L.) потиска апоптозата и намалява възпалението както при *in vitro*, така и *in vivo* модели (Zhang et al., 2013; Li et al., 2014).

В процеса на възпаление, активираният IL-1 β и TNF- α регулират провъзпалителната фосфолипаза A2, циклооксигеназа (COX-2) и индуцира азотен оксид (NO) синтез, което води до увеличаване на простагландините (PGs: синтезирани от COX-2 и NO синтез. | Повече релевантни за болката и възпалението са повишаването на PGE2, медирано от IL-1 β и TNF- α (Hyun and Kim, 2009; Charles and Dinarello, 2000). Следователно, инхибирането на COX-2 може да бъде насочено срещу противовъзпалителни лекарства намаляват болката и възпалението.

Самостоятелно екстракта индуцира експресията на COX-2 и iNOS съществено във високата концентрация спрямо нетретирания контролна група, а за АЦФ такъв ефект не се наблюдава или незначителен. Слабо се индуцира експресията на цитокина TNF- α както от ТЕ, така и от АЦФ. Значима индукция на експресията се наблюдава при IL-6 в клетките, третирани с ТЕ, като тенденцията на повишение е зависима от приложената концентрация на ТП в хранителната среда. Такава тенденция обаче не се наблюдава при клетките третирани с АЦФ, където ефекта е сходен при различните концентрации. Инхибиране на експресията на антагониста на рецептора за IL-1 β (IL-1RN) и MCP-1 ($p < 0,001$), а експресията на IL-1 β е значително понижена ($p < 0,01$). Тези данни се в съответствие с други проучвания проведени върху макрофаги, при които експресията на про и противовъзпалителните цитокини, индуцирани от LPS се понижава при претретиране с екстракти от ягода (Liu и Lin, 2012, 2013).

Друг противовъзпалителен механизъм, който може да бъде потенциално насочен от полифеноли, е MAPK пътя. MAPK участват в производството на провъзпалителни агенти (IL-6, TNF- α , iNOS) и сигнализиация по веригата от събития, които водят до възпаление и апоптоза (Thalhammer et al., 2008). MAPK се регулират чрез фосфорилиране и дефосфорилиране. Доказано е, че АКФ инхибират активирането на MAPK-фосфатаза, което от своя страна допринася за TNF- α -индуцирана клетъчна смърт (Kamata et al., 2005). Това води до предположението, че АКФ могат да участват в регулацията на MAPK.

Тези резултати предполагат, че богатата АЦФ от плодове на *Sambucus ebulus* може да инхибира експресията на TLR4, което контролира производството на провъзпалителни медиатори, включително iNOS, COX-2, IL-6 и TNF- α , водещи до намаляване на възпаления процес, който включва хронични заболявания чрез инхибиране на сигналния път на MAPK.

Високите нива на TNF- α , които се произвеждат и освобождават главно от макрофагите в отговор на LPS и други бактериални продукти стимулират производството на реагенти с остра фаза в черния дроб IL-6, фибриноген и С-реактивен протеин (CRP) и макрофаг-медирана фагоцитоза. CRP е протеин от острата фаза на възпалението и играе важна роля в патогнезата на много хронични дегенеративни заболявания като сърдечно-съдови заболявания и артрит. Повишени нива на CRP се наблюдават при почти всяко медирано възпаление. Nemmar et al. са показали, че добавяне на куркумин към диетата на мъжки мишки значително намалява хроничното възпаление чрез инхибиране на експресията на TNF- α и CRP (Nemmar et al., 2012).

Въпреки големия брой *in vitro* и *in vivo* проучвания противовъзпалителните ефекти на богата на флавоноиди диетата, изследвания са все още противоречиви и недостатъчни и повечето от тях са основават на диета на основата на храни, богати на флавоноиди, а не на проучването на ефекта на един флавоноид (Serafini et al., 2010). В подкрепа на това е работа на Hanninen et al., която съобщава, че веганска диета, състоящи се от сурови плодове, зеленчуци и корени, ядки, покълнали семена и кълнове водят до намаление на сковаността

на ставите и болка при фибромиалгични субекти и интравенозно пациенти с ревматоиден артрит (Hanninen et al., 2000). В допълнение, Jenkins et al., установяват, че консумацията на соев изофлавоон увеличава серумни концентрации на IL-6 при жени, въпреки че не е имало ефект върху протеини от остра фаза или други провъзпалителни цитокини. Въпреки това естрогенният ефект на изофлавоните беше предложен като имуномодулиращ механизъм, което би могло да обясни по-ниското честотата на някои видове рак в онези части на света, в които соята присъства основно в диетата (Jenkins et al., 2002). Въпреки това съществува неяснота за ефектите на флавоноидите върху серумните възпалителни маркери, тъй като Phillips et al. съобщават, че добавка, съдържаща смесени токофероли, флавоноиди и докозахексаноат значително намаляват серумните нива на IL-6 и CRP при мъже (Phillips et al., 2003). Полова зависимост е открита в биофлавоноидните ефекти проучвани от Дженкинс и колеги (Jenkins et al., 2002) и Song et al. съобщават за това богатите на флавоноиди храни намаляват риска от диабет тип-2 засягащи серумните нива на двата IL-6 и CRP (Song et al., 2005).

Претретирането с екстрактите има способността да намлява експресията на CRP, зависимо от приложената концентрация при ТЕ, което се потвърждава от резултатите на други автори при проучване, използващо богати на антоцианин екстракти от череши (Kelley et al., 2006).

Флавоноидите могат да инхибират експресията на хемокините. При направен PCR анализ на генната експресия на хемотаксичен моноцитен протеин 1 (MCP-1) беше установено статистически значимо инхибиране на експресията на хемокина ($p < 0,001$), както в нестимулирани макрофаги, така и в J774A.1 макрофаги с LPS индуцирано възпаление. В подкрепа на нашият резултат са твърденията на други автори, че апигенинът може да инхибира производството на MCP-1 на ниво транскрипция в J774.2 макрофаги (Kowalski et al., 2006), ефект, който също е бил докладван за епигалокатехингалат (EGCG) в съдови ендотелни клетки (Ahn et al., 2008) и за изофлавони в 3T3-L1 зрели адипоцити

(Pinet et al., 2011). Хемокините са малки цитокини, които играят значителна роля в контрола на миграцията на левкоцити. MCP-1 е хемокин, секретирани от активирани макрофаги и ендотелни клетки, чието производство е регулирано в както остри, така и хронични възпалителни заболявания. MCP-1 е медиатор на сигнализирането на макрофагите на местата на възпаление в тялото и пряко участва в развитието на атерогенезата. Антоцианините могат да осигурят защита срещу индуцирана от TNF- α MCP-1 секреция в човешки ендотелни клетки (Suganami et al., 2005). В *in vivo* проучвания направени върху плъхове на високомазнинна диета и суплементирани с лиофилизирани цели боровинки е установено значително понижаване на експресията на провъзпалителните TNF- α и MCP-1. Апигенинът инхибира освобождаването и генна експресия на MCP-1, провъзпалителен медиатор в J774.2 макрофаги. Кемпферол и кверцетин потискат производството на различни провъзпалителни медиатори от макрофаги, ендотелиални, епителни или чердробни клетки чрез инхибиране на сигнални фактори, включени в TLR4 пътя (García-Mediavilla et al., 2007; Puangraphant et al., 2009; Crespo et al., 2008).

Плодовете на *Sambucus ebulus* са богати на полифеноли съединения, затова е трудно да се установи компонентът отговорен за наблюдавания ефект. Изследванията върху специфични полифенолни фракции или храни, обогатени с определен подклас съединения могат да допринесат за идентифициране на отговорните за ефекта биологичноактивни съединения. Това, че плодовете на бъзака имат силно антиоксидантно и противовъзпалително действие не е под въпрос. Що се отнася до биологичната ефективност, количеството, необходимо за придаване на противовъзпалителни ефекти не е така ясно. Изясняването на механизмите, по които се осъществяват ефектите са от съществена, което включва фармакологична активност на рецептори, клетъчни сигнали и нива на генна експресия. От решаващо значение е, че концентрациите, необходими за активиране на тези пътища, са често пъти пониски от необходимите за директната антиоксидантна активност и много от продуктите от метаболизма на полифенолите не са толкова активни, колкото и изходните съединения. По-специално, необходимо е

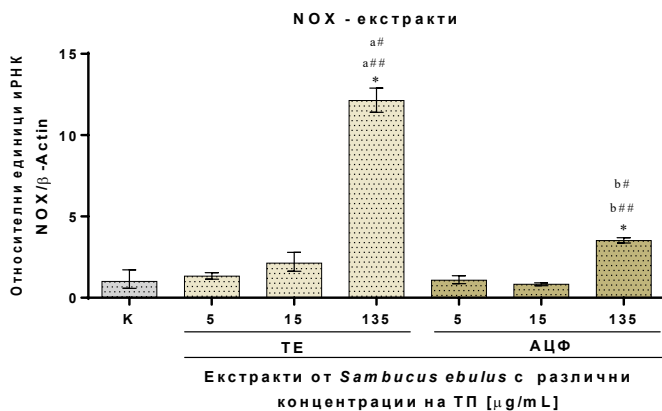
да се обърне достатъчно внимание на стабилността, абсорбцията, разпределението и метаболизма на полифенолите, за да се информира за дизайна на експериментите за изпитване на механизмите на действие *in vitro*.

8. Влияние на тоталния екстракт и получената пречиствена антоцианинова фракция от плодове на *Sambucus ebulus* върху експресията на гени свързани с фагоцитоза.

Влияние върху транскрипционните нива на НАДФН оксидаза

Експресия на НАДФН оксидаза в нестимулирани J774A.1 макрофаги

НАДФН оксидаза (NOX) е ензим отговорен за поддържане на здравословно ниво на АКФ в организма. При нормални обстоятелства в клетката експресията му е ниска, което показват и резултатите от PCR анализа на клетките третираны с ТЕ и АЦФ от плодове на *Sambucus ebulus*.



Фигура 34. Влияние на екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* върху експресията NOX в нестимулирани J774A.1 макрофаги, третирани с наратсващи концентрации от ТЕ и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група клетки.

* $p < 0,05$ спрямо К; а# $p < 0,05$ спрямо ТЕ 15; б# $p < 0,05$ спрямо АЦФ 5; а## $p < 0,01$ спрямо ТЕ 5; б## $p < 0,01$ спрямо АЦФ 15.

Ниските концентрации (5 и 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП) от ТЕ стимулират в много ниска степен експресията на ензима спрямо нетретираната контролна група клетки (Фиг. 34). Значимо повишение на експресията беше наблюдавано при групата клетки, третирани с високата концентрация от 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП от ТЕ, където експресията на ензима надвиши с повече от 1000% ($p < 0,05$) тази в нетретираната контрола

При сравнение между различните концентрации от ТЕ значимо по-висока експресия беше наблюдавана в групата третирана с концентрация от 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП, с повече от 100% ($p < 0,01$), спрямо групата макрофаги, третирана с концентрация от 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП. Подобна сигнификантност беше установена и спрямо концентрация от 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП ($p < 0,05$).

При прилагането на ниските концентрации от АЦФ беше установено понижение на експресията спрямо контролната група, докато при високата концентрация от 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП се наблюдаваше значимо по-висока експресия ($p < 0,05$).

Значими разлики бяха установени между експресиите в различните концентрации от АЦФ, така например, повишението на експресията в групата, третирана с концентрация от 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП беше измерено с 250% ($p < 0,05$) спрямо концентрация от 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП, а спрямо концентрация от 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП – с 270% ($p < 0,01$).

С цел да установим влиянието на фракционирането върху ефекта на екстракта беше направено сравнение между експресията на NOX при клетки, третирани с еднакви концентрации от двата вида екстракт. Разликите в експресията са израени в проценти и са представени в Таблица 46.

Таблица 46. Сравнение в нивата на генна експресия на NOX в J774A.1 макрофаги третирани с еднакви концентрации от ТЕ и АЦФ.

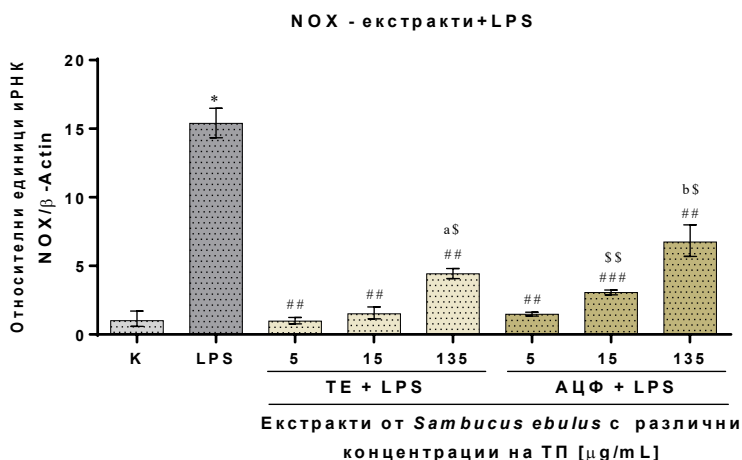
	Концентрация на ТП [$\mu\text{g}/\text{mL}$]		
	5	15	135
Разлика в експресията на NOX [%]	↓ 24%	↓ 132%	↓ 861%
p value	ns	ns	$p < 0,01$

(↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ)

Значително по-слаба индукция на NOX беше предизвикана от третиране с АЦФ в сравнение с ТЕ (135 $\mu\text{g/mL}$ ТП) ($p < 0,01$).

Експресия на NOX в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги

Стимулирането на макрофагите с LPS сигнификантно повиши, с повече от 1400% ($p < 0,05$) експресията на ензима спрямо нетретираната контролна група (Фиг.35). Претретирането на J774A.1 макрофагите с ТЕ и АЦФ и следващо LPS-индуциране доведе до значимо, зависимо от концентрацията на ТП в хранителната среда намаляване на експресията на белтъка, както при ТЕ, така и при АЦФ спрямо групата, третирана с LPS.



Фигура 35. Влияние на екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* върху експресията на NOX в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги, претретиран с наратсващи концентрации от ТЕ и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група клетки.

* $p < 0,05$ спрямо K; ## $p < 0,01$ спрямо LPS; ### $p < 0,001$ спрямо LPS; a\$ $p < 0,05$ спрямо TE+LPS 5; b\$ $p < 0,05$ спрямо АЦФ+LPS 5; \$\$ $p < 0,01$ спрямо АЦФ+LPS 5.

И трите концентрации от ТЕ доведоха до значимо понижение на експресията с повече от 1400% ($p < 0,01$) спрямо групата, третирана с LPS, които при концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП достигна нивата на

експресия на нетретрираната контролна група . Значително по-висока експресия беше установена при концентрация от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП с 345% ($p<0,05$) спрямо групата, претретрирана с концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП.

В групите клетки, претретирани с АЦФ беше наблюдавана подобна тенденция в стойностите на експресионните нива. При концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП експресията беше силно понижена спрямо групата, стимулирана с LPS с приблизително 1400% ($p<0,01$), като се приближи до експресията на нетретрираната контрола. В следващите по-високи концентрации беше отчетена експресия значимо по-ниска тази на групата, третирана с LPS, съответно с 1200% ($p<0,001$) за концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП и с 864% ($p<0,01$) за концентрация от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП.

Значимо по-високи нива на експресията бяха установени в клетките, претретирани с концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП от АЦФ със 158% ($p<0,01$) спрямо концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП, като и при концентрация от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП с повече от 500% ($p<0,05$) спрямо концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП.

При сравняване на нивата на иРНК на NOX при макрофагите, претретирани с еднакви концентрации от двата екстракта и при трите концентрации се наблюдаваше по-висока експресия при претретриране с АЦФ. Резултатите са изразени в проценти и са представени в Таблица 46.

Таблица 46. Сравнение в нивата на генна експресия на NOX в J774A.1 макрофаги претретирани с ТЕ и АЦФ с еднакви концентрации на ТП.

	Концентрация на ТП [$\mu\text{g/mL}$]		
	5	15	135
Разлика в експресията на NOX [%]	↑ 51%	↑ 155%	↑ 232%
p value	ns	ns	ns

(↑ - показва по-висока експресия в АЦФ)

За да установим ефектът на билката върху експресията на NOX в модела на LPS индуциран възпалителен отговор беше изчислен като

процент от експресията на белтъка в групата клетки третирани с LPS и са представени в Таблица 47. Във всички групи, с изключение на концентрация от 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП за АЦФ беше установено значимо по-ниска експресия в сравнение с групата, третирана с LPS.

Таблица 47. Разлики в генната експресия на NOX в проценти между претретирани с екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* J774A.1 макрофаги и такива, третирани с LPS.

Вид екстракт	ТЕ		АЦФ	
Съдържание на ПФ в хранителната среда ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS
5	↓ 94%	p<0,01	↓ 91%	p<0,001
15	↓ 91%	p<0,01	↓ 80%	p<0,01
135	↓ 71%	p<0,01	↓ 56%	ns

(↓ - показва по-ниска експресия спрямо LPS)

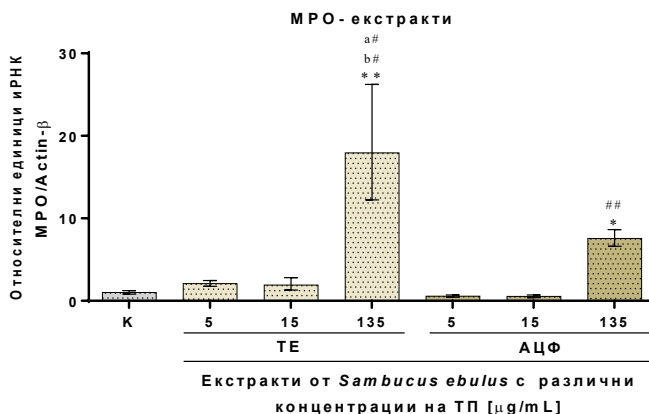
Влияние върху транскрипционните нива на МРО

Експресия на МРО в нестимулирани J774A.1 макрофаги

Миелопероксидаза (МРО) е ензим, който генерира АКФ и участва в модулирането на възпалителните отговори. В групите нестимулирани макрофаги приложената концентрация от 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП от ТЕ индуцира експресията на ензима в значителна степен с повече от 1700% (p<0,01) спрямо нетретираната контролна група клетки. Значимо по-висока беше установената експресия на високата концентрация от 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП, спрямо останалите две по-ниски концентрации с повече от 1500% (p<0,05).

Високата концентрация от 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП повишава значимо експресията на МРО спрямо нетретираната контрола с повече от 600% (p<0,05). Значимо по-висока е експресията на клетките третирани със

същата концентрация (135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП) спрямо концентрацията от 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП – със 700% ($p < 0,01$).



Фигура 35. Влияние на екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* върху експресията МРО в нестимулирани J774A.1 макрофаги, третираны с наратсващи концентрации от ТЕ и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група клетки.

* $p < 0,05$ спрямо К; ** $p < 0,01$ спрямо К; а# $p < 0,05$ спрямо ТЕ 5; б# $p < 0,05$ спрямо ТЕ 15; ## $p < 0,01$ спрямо АЦФ 15.

С цел да установим влиянието на фракционирането върху ефекта на екстракта беше направено сравнение между експресията на МРО при клетки, третираны с еднакви концентрации от двата вида екстракт. Разликите в експресията са израени в проценти и са предтсавени в Таблица 61. При концентрация от 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ТП АЦФ значимо понижи експресията на ензима спрямо ТЕ с 151% ($p < 0,05$).

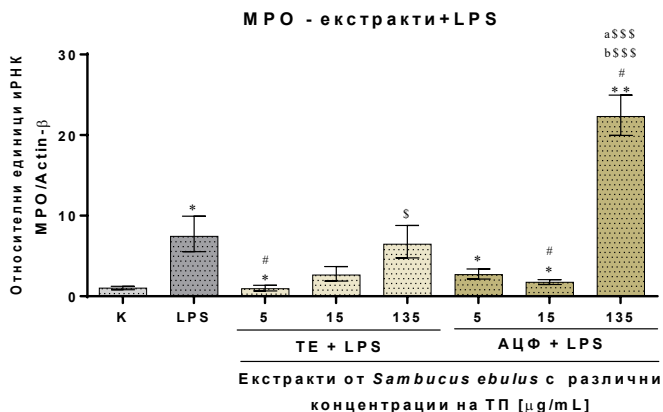
Таблица 48. Сравнение в нивата на генна експресия на МРО в J774A.1 макрофаги третираны с еднакви концентрации от ТЕ и АЦФ.

Разлика в експресията на МРО [%]	Концентрация на ТП [$\mu\text{g}/\text{mL}$]		
	5	15	135
Разлика в експресията на МРО [%]	↓ 151%	↓ 138%	↓ 1038%
p value	$p < 0,05$	ns	ns

(↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ)

Експресия на МРО в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги

Стимулирането на макрофагите с LPS доведе до значимо повишаване на експресията на ензима с 642% ($p < 0,05$) спрямо нетретираната контролна група клетки (Фиг. 36). При претретирането с избраните концентрации от ТЕ с последващо LPS индуциране беше наблюдавано значимо понижаване на експресията при групата, претретирана с концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП с 648% ($p < 0,05$) спрямо групата, третирана с LPS, като достига стойности по-ниски от тези на нетретираната контрола. Сигнификантно по-висока експресия беше установена при концентрация от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП спрямо концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП с 553% ($p < 0,05$).



Фигура 36. Влияние на екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* върху експресията на МРО в LPS стимулирани J774A.1 макрофаги, претретиран с нарастващи концентрации от ТЕ и АЦФ. Генната експресия е изчислена спрямо контролната група клетки

* $p < 0,05$ спрямо К; ** $p < 0,01$ спрямо К; # $p < 0,05$ спрямо LPS; \$ $p < 0,05$ спрямо ТЕ+LPS 5; a\$\$\$ $p < 0,001$ спрямо АЦФ+LPS 5; b\$\$\$ $p < 0,001$ спрямо АЦФ+LPS 15

В групите претретиран с АЦФ при концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП беше наблюдавано значимо по-ниско ниво на експресията спрямо контролата с LPS с 570% ($p < 0,05$). Високата концентрация от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП повишава експресията многократно и значимо като спрямо

клетките, третирани с LPS ($p < 0,05$), така и спрямо нетретираната контролна група ($p < 0,01$). Значимо по-високи са отчетените нива на генна експресия в същата група клетки спрямо останалите две концентрации от АЦФ, както следва – с повече от 1900% ($p < 0,001$) спрямо концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП и с повече от 2000% ($p < 0,001$) спрямо концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП.

При сравняване на нивата на иРНК на МРО при макрофагите, претретирани с еднакви концентрации от двата екстракта беше установен различен ефект при различните концентрации. Резултатите са изразени в проценти и са представени в Таблица 48. Ниската концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП, както и високата от 135 $\mu\text{g/mL}$ ТП значимо повишават стойностите на експресията при АЦФ, в сравнение със същите концентрации от ТЕ.

Таблица 48. Сравнение в нивата на генна експресия на МРО в J774A.1 макрофаги претретирани с ТЕ и АЦФ с еднакви концентрации на ТП.

	Концентрация на ТП [$\mu\text{g/mL}$]		
	5	15	135
Разлика в експресията на МРО [%]	↑ 175%	↓ 89%	↑ 1585%
p value	$p < 0,05$	ns	$p < 0,05$

(↓ - показва по-ниска експресия в АЦФ; ↑ - показва по-висока експресия в АЦФ)

За да установим ефектът на билката върху експресията на МРО в модела на LPS индуциран възпалителен отговор беше изчислен като процент от експресията на белтъка в групата клетки третирани с LPS и са представени в Таблица 49.

Таблица 49. Разлики в генната експресия на МРО в проценти между претретирани с екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* J774A.1 макрофаги и такива, третирани с LPS.

Вид екстракт	ТЕ	АЦФ
--------------	----	-----

Съдържание на ПФ в хранителната среда ($\mu\text{g/mL}$)	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS	Генна експресия [%]	p value спрямо LPS
5	↓ 87%	p<0,05	↓ 64%	ns
15	↓ 65%	ns	↓ 77%	p<0,05
135	↓ 13%	ns	↑ 200%	p<0,05

(↓ - показва по-ниска експресия спрямо LPS; ↑ - показва по-висока експресия спрямо LPS)

Ниската концентрация от 5 $\mu\text{g/mL}$ ТП от ТЕ, както и концентрация от 15 $\mu\text{g/mL}$ ТП за АЦФ значимо понижават стимулиращият ефект на LPS. Високата концентрация от АЦФ (135 $\mu\text{g/mL}$ ТП) значимо стимулира ефекта на LPS.

Обсъждане

Фагоцитозата е процес провокиран от производството на вътреклетъчни АКФ в макрофагите. АКФ са ключов фактор при възпалителни процеси, като при физиологични, така и при патологични състояния. Основна роля на макрофагите е активното елиминиране на патогени чрез фагоцитоза. За да се инициира фагоцитоза макрофагите реагират на хемокини, които индуцират тяхната миграция към мястото на възпаление или увреждане на тъканите. Хемотаксисът и миграцията предшества фагоцитоза и включват сигнали, които активират първичните макрофаги за поглъщане на патогени или клетъчни останки. Хемотаксичните сигнали активират полимеризация на актини и образуване на филоподи, улесняващи движение към мястото на възпаление или нараняване.

При провъзпалително активиране фагоцитиращите клетки, като макрофаги и моноцити произвеждат голямо количество АКФ, главно под формата на супероксиден анион и последващо образуване на радикали в процеса на „респираторен взрив“ (Valko et al., 2007). Процеса на високо кислородно потребление и продуциране на супероксиден анион, който съпътства респираторния взрив се контролира от ензима NOX (Nauseef, 2008). Активираната фагоцитна

оксидаза освобождава супероксиден анион в рамките на фагозомата, който след това претърпява дисмутация в H_2O_2 .

Умерената антимикробна активност на водородния пероксид е от съществено значение за миелопероксидазата (MPO), което от своя страна води до производството на $HOCl$, с последващо омреждане на микробните протеини, ковалентно свързване на SH-групи, хемпротеини, естерни групи, липиди, понижавайки жизнеспособността на патогените (Robinson et al., 2004).

Високите нива на АКФ обаче могат да бъдат вредни за тях и са достатъчна причина да причинят апоптоза на макрофагите (Bauer et al., 2011.; Essler et al., 2009). Производството на АКФ в макрофагите се дължи основно на ензимите супероксиддисмутаза (SOD) и NADPH оксидаза (NOX). Фагоцитозата на макрофагите изисква NOX-зависима продукция на АКФ (Brown et al., 2009). Макрофаги с дефицит на NOX, не успяват ефективно да осъществяват фагоцитоза на апоптичните клетки (Sanmun et al., 2009).

В макрофагите, стимулирани с LPS нивата на експресия на NOX и MPO бяха значително завишени спрямо нетретираната контрола.

АКФ играят основна роля в регулиране, както на осторото, така и на хроничното възпаление. Някои цитокини и растежни фактори използват АКФ като вторични посредници, например $TNF\alpha$ стимулира производството на H_2O_2 , определяйки митогенезата и клетъчната смърт, подобно на производството на провъзпалителни медиатори (MCP-1, IL-6) и активирайки NF- κB (Thannickal et al., 2000; Satriano et al., 1993). Други автори съобщават, че IL- 1β индуцира производството на АКФ, като вторични посредници, чрез NOX-зависимо производство на H_2O_2 и $O_2^{\cdot-}$, в резултат на което настъпва съдово увреждане, ангиогенеза, възпаление, треска (Matsubara et al., 1986; Meier et al., 1989).

Много медиатори на възпаление стимулират производството на NOX-зависим супероксид, като например серотонинът, чиито ефект е насочен към митогенезата на мускулните клетки, чрез активиране на екстрацелуларни сигнално-регулирани кинази (Lee et al., 1998).

Тромбин индуцира освобождаването на АКФ от NOX в ендотелни клетки, като по този начин регулира клеръчния растеж, MAPK активиране и фосфолипазависимите сигнални пътища (Holland et al., 1998). Протеинкиназа В и С също се подлагат на регулацията, зависеща от АКФ (Dempsey et al., 2000). Стимулирането на макрофагите с екзогенен H₂O₂ активира p38 MAPK (Valko et al., 2007). Също така се съобщава, че реакцията на макрофагите към простагландини и възпалителни цитокини като IL-6 зависи от редокс статуса на самите макрофаги (Droge, 2002).

NOX се активира от NF-κB (Bedard et al., 2007). Тъй като бери антоцианините инхибират активирането на NF-κB, то е възможно е увеличаването на клетъчните нива на АКФ с LPS стимулиране да отслабва при претретиране на макрофагите с полифеноли и антоцианина. Това се дължи на инхибиторен ефект на флавоноидите върху експресията на NF-κB-зависимата NOX. При стимулиране на макрофагите се наблюдава повишена експресия на NOX от LPS ($p < 0,05$), която се инхибира значимо и дозозависимо при претретиране на клетките с екстракта и фракцията ($p < 0,001$). Свързването на LPS към TLR4 рецептора води до генериране на АКФ от NOX (Hsing et al., 2011).

Възпалителни нарушения се дължат на прекомерното производство на про-възпалителни медиатори като TNFα, GM-CSF, IL-1, IL-6, IL8, левкотриен B4 и PAF, активността на възпалителни клетки, такива като като неутрофили, моноцити и макрофаги и прекомерно производство на АКФ (Babior, 2000; Nathan, 2006; Ley, 2002). Полиморфонуклеарните неутрофили играят ключова роля в защитата на гостоприемника срещу нахлуващи микроорганизми (Hampton et al., 1998), но прекомерното активиране на неутрофили участва в увреждане на тъканите, свързано с възпалителни нарушения (Babior, 1984, 2000). В отговор на различни агенти, неутрофилите мигрират към възпалителни места, където те освобождават протеази, бактерицидни пептиди и големи количества АКФ в процес, известен като респираторен взрив (Babior, 1984). Редукция на кислород чрез неутрофил NOX, многокомпонентна ензимна система, дава

супероксиден анион (El-Benna et al., 2005), докато МРО произвежда хипохлорна киселина от водороден пероксид (Klebanoff, 2005).

Флавоноидите упражняват пряко антиоксидантната си активност върху имунните клетки, чрез способността си да елиминират АКФ, генерирани от активирани неутрофили и макрофаги, както и да намаляват производство им чрез инхибиране на NOX, ксантин оксидаза и МРО (Edwards et al., 1996).

Резултатите от проучване на цианидин-3-глюкозида в алвеоларни макрофаги показват, че намалява увреждането на белите дробове и МРО активността. Това показва, че цианидин-3-глюкозида има защитен ефект от LPS-индуцираното остро белодробно увреждане (Wang et al., 2013).

В това проучване ние показахме, че ТЕ и АЦФ от плодове на *Sambucus ebulus* инхибират зависимо от приложената концентрация експресията на МРО, както и на NOX, което обяснява противовъзпалителният им ефект в LPS-стимулирани макрофаги. МРО стимулира макрофагите за производство на АКФ, което от своя страна усилва експресията на TNF- α и други провъзпалителни цитокини (Nelson and Summer, 1998; Gelderman et al., 1998).

Неутрофилите отделят МРО, което отразява инфилтрация на неутрофили и корелира с броя им (Zhang et al., 2010) в извънклетъчната среда при LPS стимулация, като по този начин генерира МРО-извлечени оксиданти и води до увреждане на тъканите. В развитието и прояви на остър респираторен дистрес, оксидативният стрес причинява сериозно увреждане на клетъчната структура и функция (Mishra et al., 2007; Sakaguchi et al., 2006). Освен това, алвеоларните макрофаги фагоцитират и активно убиват нахлуващите патогени освобождаване на клетъчни медиатори за индуциране на възпаление и имунни отговори.

Нашето проучване показва, че ТЕ и АЦФ понижават експресията на МРО в сравнение с нетретираната контролна група. Очаквано, претретирането на макрофагите с екстракта и фракцията с последващо LPS стимулиране доведе до значително понижение на LPS-индуцираното повишение на експресията на МРО, което е в

съответствие с проуванията на други автори (Fu et al., 2014). Резултатът получен в нашето изследване се потвърждава и от други автори при проучвания направени върху клетки , третирани с екстракти от ягода, преди инкубация с LPS (Lee et al., 2013; Mo et al., 2014). Тези резултати предполагат, че екстракта и фракцията от плодове на *Sambucus ebulus* могат да намалят LPS-индуцираното възпаление чрез инхибиране на експресията на MPO. MPO-съдържащите макрофаги продуцират HOS1, специфичен MPO-получен реактивен кислород, в отговор на патофизиологични стимули

В заключение можем да кажем, че предварителното третиране на J774A.1 макрофаги с ТЕ и АЦФ от плодове на *Sambucus ebulus* намалява вътрекелтъчните нива на АКФ, намалява апоптозата в клетки третирани с LPS. Това дава възможност да се твърди, че екстрактите от плодове на бъзак противодействат на LPS-медираното възпаление чрез модулиране на сигнални пътища и редукция на АКФ.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Като билка, позната от древността *Sambucus ebulus* има дълга история като част от народната медицина, а също така и в съвременната фармация. Екстрактът и получената от него богата на антоцианини фракция беше охарактеризирана по отношение на фенолен състав. Екстрактът и фракцията проявяват висока антиоксидантна активност, оценена по два *in vitro* метода (ABTS и DPPH). Въз основа на изследваната *in vitro* биологична активност на тоталния екстракт и антоцианиновата фракция в J774A.1 макрофаги и обсъдените резултати можем да заключим, че в нестимулирани с LPS клетки те повлияват антиоксидантната защита като стимулират експресията на GCL и GPx-1 и, вероятно поради антиоксидантните свойства на съдържащите се в тях биологично активни вещества, намаляват експресията на GS, GR и SOD.

В условия на LPS третиране, за което е доказано, че индуцира оксидативен стрес и възпалителен отговор, изследваните екстракти проявяват протективно действие, като понижават стимулиращия ефект на LPS върху експресията на GCL, GPx-1, GS и GR, и възстановяват експресионните нива на SOD, които се понижават от LPS.

Изследваните TE и АЦФ имат ефект върху процеси, свързани с имунната защита – възпаление и фагоцитоза. В нестимулирани с LPS клетки ниските концентрации стимулират експресията на IL-6, CRP, iNOS и TLR-4 и намаляват експресията на TNF- α , IL-1 β , IL-1RN, MCP-1 и COX-2. В същото време, обаче, високите концентрации стимулират във висока степен експресията на CRP, iNOS, TLR-4, COX-2, MPO и NOX, което е в подкрепа на необходимостта от допълнителни научни данни във връзка с осъзната, научно аргументирана и безопасна употреба на билката.

В условия на индуциран възпалителен отговор изследваните екстракти, приложени като претретиране, намаляват стимулиращото действие на LPS, като понижават експресионните нива на всички изследвани гени, свързани с възпаление и фагоцитоза.

Тоталния екстракт и антоцианиновата фракция проявяват ясно изразен цитопротективен ефект, подобрявайки клетъчната жизненост в условия на LPS индуцирана цитотоксичност.

Необходими са допълнителни *in vivo* и аналитични проучвания, за да се разкрият по-обхватно механизмите на действие на антоцианиновата фракция от плодове на *Sambucus ebulus*, за да се получат повече данни за приложимостта и като суровина при производството на храни и лечебни средства и като подкрепяща и допълваща терапия.

VII. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ

Изводи

1. Разработена и оптимизирана е **екстракционна процедура** за получаване на общ екстракт и на богата на антоцианини фракция от плодове на *Sambucus ebulus*, със **запазена биологична активност** на полифенолните съединения.
2. Процентното съдържание на антоцианини спрямо общото фенолно съдържание в пречистената антоцианинова фракция е **по-високо** от това в общият екстракт, което е индикация за **ефективността на разработената екстракционна процедура**.
3. Съдържанието на общи полифеноли, общи флавоноиди и общи мономерни антоцианинови пигменти в екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* зависи от **начина на съхранение на плодовете**, като в изследваните екстракти са установени **по-високи** стойности при **замразените плодове** в сравнение с изсушените.
4. Антиоксидантната активност, оценена по двата метода – способност за електронен пренос (ABTS-метод) и пренос на водороден атом (DPPH-метод) в екстракти от плодове на *Sambucus ebulus*, зависи от **начина на съхранение** на плодовете. **По-високи** стойности се установяват при **замразените** плодове в сравнение с изсушените в изследваните екстракти.
5. Разработен и валидиран е **бърз, прецизен, точен и селективен** хроматографски метод с маселективна детекция (LC-PDA-MS) за **едновременна** идентификация и количествено определяне на **седем полифенола** в екстракти от плодове на *Sambucus ebulus*.
6. С разработения LC-PDA-MS метод е установено съдържание на три свободни полифенолни съединения, **епикатехин** (0.84 mg/100 g FW), **кверцетин** (0.15 mg/100 g FW) и **кемпферол** (0.05 mg/100g FW), в тотален ацетонов екстракт от зрели плодове на *Sambucus ebulus*.
7. В нестимулирани с LPS макрофаги ТЕ, ХФ и АЦФ проявяват **пролиферативно** действие във всички

изследвани концентрации (0,5 – 135 µg/mL ТП), с изключение на ТЕ, където след достигане на максимум клетъчната жизнениост започва да намалява и при концентрация от 135 µg/mL ТП е значимо по-ниска от нетретираната контролна група.

8. Антоцианиновата фракция **не проявява** цитотоксично действие върху макрофаги, като при всички приложени концентрации, в диапазона от 0,5 до 135 µg/mL ТП се установява увеличена клетъчна жизнениост в сравнение с нетретираната контрола.
9. ТЕ, ХФ и АЦФ проявяват **цитопротективно и пролиферативно** действие при J774A.1 макрофаги в модел на LPS индуцирана цитотоксичност.
10. Във всички приложени концентрации обогатената на **антоцианини фракция** от плодове на *S. ebulus* проявява **най-изявено** цитопротективно и пролиферативно действие в модел на LPS индуцирана цитотоксичност,
11. В нестимулирани макрофаги тоталният екстракт и пречистената антоцианинова фракция от плодове на *Sambucus ebulus*:
 - Стимулират генната експресия на ензимите GCL и GPx-1, като ефектът се засилва с увеличаване на концентрацията на тотални полифеноли в хранителната среда.
 - Понижават експресията на ензимите от метаболизма на глутатион – GS и GR, а също така и на SOD-2.
 - Проявяват имуномодулиращо действие, като индуцират генната експресия на белтъци, пряко свързани с контрола и протичането на възпалителен процес: TLR-4, TNF α , IL-6, COX-2, CRP и iNOS и понижават генната експресията на IL-1 β и IL-1RN.
 - Повишават експресията на фагоцитарните ензими NOX и MPO.
12. В модел на LPS индуциран оксидативен стрес и възпалителен отговор в макрофаги, тоталният екстракт и пречистената антоцианинова фракция от плодове на *S. ebulus*:
 - понижават стимулиращия ефект на LPS върху експресията на GCL, GPx-1, GS и GR, и възстановяват експресионните нива на SOD.

- Проявяват противвъзпалително действие, като понижават индуцираната от LPS експресия на белтъци, пряко свързани с контрола и протичането на възпалителен процес: TLR-4, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-1RN, CRP, COX-2 и iNOS.
- Повлияват процеса на фагоцитоза, като понижават индуцираната от LPS експресия на ензимите NOX и MPO.

Приноси

1. Разработена и оптимизирана е нова за катедрата по биохимия екстракционна процедура за получаване и пречистване на антоцианинова фракция от плодове на Бъзак (*Sambucus ebulus*), която може да се прилага при екстракция на полифенолни съединения и от други лечебни растения.

2. Валидирани и адаптирани са нови за катедрата по биохимия спектрофотометрични методи за определяне на фитохимичен състав (общи флавоноиди и общи мономерни антоцианини), за които са изготвени стандартни оперативни процедури.

3. Валидиран и адаптиран е нов за катедрата по биохимия метод за оценка на антиоксидантна активност на биологични екстракти, чрез способността им за пренос на водороден атом.

4. За пръв път е разработен и валидиран хроматографски метод с тандемна UV и маселективна детекция за едновременна идентификация и количествено определяне на полифенолни съединения в растителни екстракти.

5. С разработения хроматографски метод за пръв път е установено съдържание на свободен кемпферол в ацетонов екстракт от плодове на *Sambucus ebulus*.

6. За пръв път е установено цитопротективно действие на тотален ацетонов екстракт и обогатена на антоцианини фракция от плодове на *Sambucus ebulus* в модел на LPS-индуцирана цитотоксичност.

7. За пръв път е установено модулиращо действие на тотален ацетонов екстракт и обогатена на антоцианини фракция от плодове на *Sambucus ebulus* в модел на LPS-стимулиране върху гени, свързани с антиоксидантната защита.

8. За пръв път е установено имуномодулиращо действие на тотален ацетонов екстракт и обогатена на антоцианини фракция от плодове на *Sambucus ebulus* в модел на LPS-стимулиране върху гени, свързани с имунната защита – ензими и фактори на възпалението, фагоцитарни ензими.

VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ

Публикации свързани с дисертационния труд

1. Miglena Todorova, Bistra Galunska, Yoana Kiselova, B. THE EXTRACTION STEP: A CRUCIAL STAGE IN ANTHOCYANIN ISOLATION FROM BERRY FRUITS, Collection of articles from the National Scientific Conference “ 15 Years of Pharmacy in Medical University - Plovdiv”(pp.246-253) 2018.

2. Daniela V. Vankova, Miglena N. Todorova, Yoana D. Kisselova-Kaneva & Bistra Ts. Galunska (2019): Development of new and robust LC-MS method for simultaneous quantification of polyphenols from Sambucusebulus fruits, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, DOI: 10.1080/10826076.2019.1614053.

3. Miglena TODOROVA, Oskan TASINOV, Milena PASHEVA, Diana IVANOVA, Bistra GALUNSKA, Yoana KISELOVA-KANEVA. Cytoprotective activity of Sambucus ebulus fruit extracts in conditions of tert-Buthylhydroperoxyde induced cell toxicity, .Bulgarian Chemical Communications, BCC-51-A9 (под печат).

Участия в научни конференции свързани с дисертационния труд

1. Miglena Todorova, Bistra Galunska, Yoana Kiselova, Б. 2018. THE EXTRACTION STEP: A CRUCIAL STAGE IN ANTHOCYANIN ISOLATION FROM BERRY FRUITS 15-години Фармация в Медицински университет – Пловдив, 1-3 юни, хотел Орфей, Девин, България.

2. Miglena Todorova, Bistra Galunska, Yoana Kiselova, Effect of drying and frozen storage on polyphenol content and antioxidant activity of Sambucus ebulus berries. 28-th Annual Assembly of IMAB and 5-th International Meeting of Alumni Club at Medical University Varna, 13-16 May, Congress center, Hotel Admiral, Resort Golden Sands, Varna, Bulgaria.

3. Miglena Todorova, Oskan Tasinov, Milena Pasheva, Bistra Galunska, Deyana Vankova, Diana Ivanova, Yoana Kiselova-Kaneva. Markers for cellular response in j774a.1 macrophage cell culture in a model of bacterial lipopolysaccharides stimulation. International conference "Modern molecular-biochemical markers in clinical end experimental medicin-2018", 31 October-02 November 2018, Prague, The Czech Republic.

4. Ванкова Д., Тодорова М., Киселова Й., Галунска Б. Разработване и валидиране на UPLC-UV-MS метод за количествено определяне на флавоноиди в растителни екстракти. ПЕТИ ФАРМАЦЕВТИЧЕН БИЗНЕС ФОРУМ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКА КОНФЕРЕНЦИЯ, 26-28 октомври 2018, Варна.

5. Miglena TODOROVA, Oskan TASINOV, Milena PASHEVA, Diana IVANOVA, Bistra GALUNSKA, Yoana KISELOVA-KANEVA. Cytoprotective activity of Sambucus ebulus fruit extracts in conditions of tert-Buthylhydroperoxyde induced cell toxicity, 2nd International Conference on BIO-ANTIOXIDANTS 7-10 September 2018, Varna, Bulgaria.

IX. Финансиране

Проект № 17020, Конкурсна сесия 2017, Фонд „Наука“ при Медицински Университет – Врана - „Получаване на богат на антоцианини екстракт от плодове на бязак (*Sambucus ebulus*) и охарактеризиране на биологичната му активност във връзка с установяване на адаптогенен потенциал с оглед използването му като суровина при производство на храни и лечебни средства“.

Ръководител на проекта: Доц. Йоана Димитрова Киселова-Кънева, дб

