

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

СТЕФКА МАРИНОВА СТОЕВА

Сравнително проучване биологичните ефекти на природни хранителни източници на сяра върху човешки интестинални клетки

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на научна и образователна степен

„ДОКТОР“

по докторска програма - „БИОХИМИЯ“

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:
ДОЦ. МИЛКА НАШАР, Д.Б.

ВАРНА
2026

Дисертационният труд е обсъден на заседание на Катедрен съвет на Катедра „Биохимия, мплекулна медицина и нутригеномика“ при Медицински университет – Варна и е насочен за защита пред **Научно жури** в състав:

Външни членове:

Проф. Светла Димитрова Петрова-Чанкова, дб

Проф. Анелия Веселинова Биволарска, дб

Доц. Милена Танкова Цанова-Стоева, дхн

Резервен външен член:

Проф. Албена Георгиева Йорданова, дб

Вътрешни членове:

Проф. Диана Георгиева Иванова, дбн

Проф. Йоана Димитрова Киселова-Кънева, дб

Резервен вътрешен член:

Доц. Деяна Георгиева Ванкова, дб

Дисертациониият труд съдържа 154 страници, 73 фигури, 2 схеми, 1 снимка и 6 таблици. Цитирани са 298 заглавия.

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на **25 ноември 2026 г. (сряда) от 13:30 часа**, в Заседателната зала на Факултета по фармация и във виртуална зала на електронната платформа Webex на Медицински университет – Варна.

***Забележка:** Номерирането на фигурите и таблиците в автореферата не съответствт на това в дисертацията*.

СЪДЪРЖАНИЕ…….…стр.

ВЪВЕДЕНИЕ……..……...…4
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ……..…..…6
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ……..……7
РЕЗУЛТАТИ ……...…10
Ефект на СМВ и СБАВ върху клетъчната жизненост……10
Експресия на целеви гени в модел на ЛПЗ-индуцирано възпаление ……..12
Ефект върху експресията на NF-kB……..……13
Ефект върху експресията на TNF-α……..16
Ефект върху експресията на IL-6……18
Ефект върху експресията на IL-8……..……..20
Ефект върху експресията на COX-2……..……22
Ефект върху експресията на CASP1……24
Ефект върху експресията на IL-1β……..26
Ефект върху експресията на IL1RN……..28
Ефект върху експресията на NRF2……..30
Ефект върху експресията на GPx……..……33
Ефект върху експресията на SIRT1……..35
Ефект върху експресията на FOXO 4……..……37
Ефект върху експресията на SULT1A1……..…..39
Ефект върху експресията на SULT1A3……41
Корелационни анализи…….……..…43
Експресионни зависимости под действието на СМВ……..43
Експресионни зависимости под действието на СФН……..44
Експресионни зависимости под действието на ТАУ……..45
Експресионни зависимости под действието на АЛИ……..46
Интегриран сравнителен анализ на експресионните зависимости под действието на изследваните хранителни източници на сяра……..47
ДИСКУСИЯ…….……..……48
ИЗВОДИ…….……..60
ПРИНОСИ…….…….. 61
СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД…….……62
ФИНАНСИРАНЕ……64

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Природните източници на сяра включват растителни и животински храни, както и минерални води със специфичен йонен и газов състав. Особен интерес, поради потенциалните им благоприятни ефекти върху човешкото здраве, представляват кръстоцветните зеленчуци, растенията от род *Allium*, богатите на таурин храни и сярасъдържащите минерални води. Биологичната им значимост се определя от способността на съдържащите се в тях активни компоненти да повлияват сигнални пътища, свързани с редокс хомеостазата, възпалението, клетъчната адаптация към стрес и процесите на детоксикация.

Сярасъдържащите минерални води са широко разпространени, включително в райони без вулканична активност, какъвто е България. Техните свойства и приложение зависят от химичната форма на сярата. Водите, в които тя присъства предимно като сулфатен йон (SO_4^{2-}), се определят като сулфатни, а природните води, съдържащи сероводород (H_2S) - като серни минерални води. Във водна среда H_2S се намира в равновесие с хидросулфидния (HS^-) и сулфидния (S^{2-}) анион. Недисоцииранияят H_2S е липофилна молекула, способна да преминава през клетъчните мембрани и да функционира като газов сигнален медиатор. Минералните води от Варненския басейн се класифицират като серни поради съдържанието им на H_2S.

Сред основните сярасъдържащи съединения от хранителен произход са сулфорафанът, алиинът и тауринът. Сулфорафанът е изотиоцианат, характерен за растенията от род *Brassica*, включително броколи, карфиол и къдраво зеле. Той е сред най-изследваните представители на тази група поради установените му антиоксидантни, противовъзпалителни и противотуморни свойства. Консумацията на кръстоцветни зеленчуци се свързва и с намален риск от метаболитни нарушения, протичащи с хронично нискостепенно възпаление.

Алиинът е основен органосулфид в чесъна (*Allium sativum*) и прекурсор на алицина. На органосулфидите в чесъна се приписват антиоксидантните, противовъзпалителните, имуномодулиращи, кардиопротективните, противотуморните, хепатопротективните и антимикробни ефекти на растението.

Тауринът е условно есенциална сулфонирана β-аминокиселина, синтезирана в човешкия организъм от цистеин. Въпреки че не участва в изграждането на белтъци, той е широко разпространен в организма и се съдържа във високи концентрации в мозъка, ретината, мускулната тъкан и фагоцитиращите клетки. Тауринът проявява антиоксидантни и цитопротективни свойства и допринася за поддържането на клетъчната хомеостаза при остро и хронично възпаление.

Въпреки натрупаните данни за отделните природни източници на сяра, сравнителните изследвания на техните биологични ефекти върху чревни епителни клетки са ограничени. Стомашно-чревният тракт е първото основно място на взаимодействие на постъпващите с храната и водата активни съединения с организма, поради което чревните клетъчни линии представляват подходящ модел за изследване на техните механизми на действие при нормални условия и възпаление.

В този контекст настоящото проучване е насочено към сравнителна оценка на биологичните ефекти на сярасъдържащите биологично активни съединения от хранителни източници и на сярна минерална вода от Варненския басейн върху човешки интестинални епителни клетки.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

2.1. ЦЕЛ

Настоящото изследване имаше за цел да извърши сравнителен анализ на биологичните ефекти на природни харнителни източници на сяра в базални условия и в условията на ЛПЗ-индуцирано възпаление в човешки интестинални епителни клетки.

2.2. ЗАДАЧИ

1. Определяне на клетъчна жизненост при третиране на клетъчна линия HIEC-6 със:

- сяра-съдържаша минерална вода
- сулфорафан
- таурин
- алиин

2. Оценка на потенциала на изследваните източници на сяра да влияят върху експресията на таргетни гени, свързани с:

- регулацията и медиирането на възпалителния отговор
- антиоксидантния отговор
- клетъчната адаптация и преживяемост
- биотрансформацията

3. Интеграция на получените данни и сравнителен анализ на противовъзпалителния, антиоксидантен и адаптогенен профил на изследваните източници на сяра

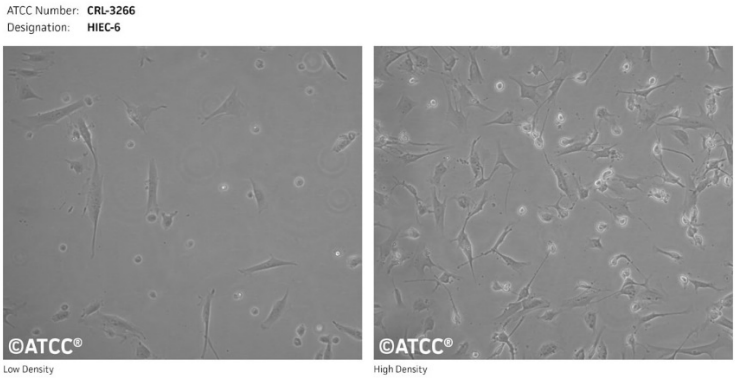
3. Анализ на потенциала на изследваните източници на сяра да влияят върху процесите на детоксикация

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. МАТЕРИАЛИ

3.1.1. Клетъчна линия

В настоящото изследване е използвана адхезивна клетъчна линия от човешки чревни епителни клетки (Human intestine epithelial cells, HIEC-6) (снимка 1), закупени от Американската колекция за типови култури (ATCC® CRL3266™)



***Снимка 1**. Клетъчна линия HIEC6 (ATCC® CRL3266 ™) използвана в изследването*

3.2. МЕТОДИ

3.2.1. Вземане на проби от Варненска минерална вода

Клетките бяха третирани със сярна минерална вода (СМВ), наливана от обществена чешма "Аквариум" в гр. Варна. Пробите престояваха 24 часа при 4°С, като се темперираха на стайна температура в продължение на двва часа преди експеримента. Непосредствено преди всеки експеримент, пробите от СМВ бяха филтрирани през стерилен филтър и се , темперираха в термостат на 37 °С.

3.2.2. Субкултивиране на клетъчната култура

За култивиране на тази клетъчна линия се използва Opti-MEM™ I редуцирана серумна среда, модифицирана с L-глутамин и фенол ред. Клетките бяха намножавани в 75 cm^2 колби (фласки) и инкубирани при 37°С във влажна атмосфера от

95% въздух и 5% CO_2. За приготвяне на концентрациите за третиране в различните експерименти е използвана хранителна среда Opti-MEM™ I без фенол ред.

3.2.3. Тест за цитотоксичност (MTT)

Методът за определяне на цитотоксичността на различни агенти се основава на способността на ензимните системи на жизнеспособните клетки да редуцират 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (MTT), 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%. На базата на резултатите от MTT теста, от всяко третиране бяха избрани по 3 концентрации за следващите експерименти, както следва: СМВ % (4, 6, 8); СФН μg/mL (0.5, 1, 2); АЛИ μg/mL (10, 25, 30); ТАУ mM (1, 2, 5).

3.2.4. Индуциране на възпаление с липополизахариди (ЛПЗ)

За индуциране на възпалителен отговор беше използван ЛПЗ от *Escherichia coli,* серотип 026:B6. След засяване за експеримент, клетките се пре-третираха с избраните концентрации сяра-съдържащ източник за 24 часа, с последващо третиране с 1 μg/mL ЛПЗ.

3.2.5. Определяне нивото на генна експресия

За определяне нивото на генна експресия на избрани гени в клетъчни култури се използва двустъпков количествен Real-Time PCR (полимеразна верижна реакция в реално време).

Екстракция на тотална РНК от клетките: След приключване на експеримента клетките бяха третирани с реагент Primezol за изолиране на тотална РНК. Протоколът следваше изцяло към указанията на производителя.

Обратна транскрипция – RT-PCR: Екстрахираната РНК (200 ng) беше използвана за синтез на копи ДНК, използвайки кит за синтез на кДНК съдържащ олиго (dT)18 праймер и обратна транскриптаза.

Количествена полимеразна верижна реакция в реално време (RT-qPCR): Втората стъпка при количествен Real-Time PCR анализ е амплификация на кДНК в реално време с ген-

специфични праймери. Нуклеотидните последователности на праймерите, използвани за анализ са представени в таблица 1:

***Таблица 1**. Нуклеотидните последователности на праймерите на изследваните гени*

Ген (*Homo sapiens*)	**Нуклеотидна секвенция**
ACTB	F: 5'- GTGGCCGAGGACTTTGATTG - 3' R: 5'- CCTGTAACAACGCATCTCATA - 3'
RPLP0	F: 5'-AGCCCAGAACACTGGTCTC-3' R 5'-ACTCAGGATTTCAATGGTGCC-3'
COX-2	F: 5'- GAAACAGAGAAGTTGGCAGCA - 3' R: 5'- GGCAGGATACAGCTCCACAG- 3'
TNFα	F: 5'- CTCTTCTGCCTGCTGCACTTT - 3' R: 5'- ATGGGCTACAGGCTTGTCACT - 3'
IL-1β	F: 5' CCACCTCCAGGGACAGGATA - 3' R: 5' AGAATTAGCAAGCTGCCAGGA 3'
IL1RN	F: 5' - GCCCATCCTCAGGACCTTTC - 3' R: 5' - ATGTCCTAGCCATCCCCACT - 3'
IL-6	F: 5' – GGCACTGGCAGAAAACAACC - 3' R: 5' - GCAAGTCTCCTCATTGAATCC - 3'
IL-8	F: 5' – AGCCTTCCTGATTTCTGCAG - 3' R: 5' – GTCCACTCTCAATCACTCTCAG - 3'
NF-kB	F: 5' – GTGGTGCCTCACTGCTAACT R: 5' – GGATGCACTTCAGCTTCTGT
Nrf2	F: 5' - TACTCCCAGGTTGCCCACAT - 3' R: 5' - TGACTGAAACGTAGCCGAAGA - 3'
Caspase 1	F: 5' - TGTGTCTTTCCAGACAGCCC - 3' R: 5' - GCCCCAACAAAGATGTCCTGT - 3'
GPx	F: 5' - GAGGCAAGACCGAAGTAAACTAC - 3' R: 5' - CCGAACTGGTTACACGGGAA - 3'
Sirt1	F: 5' – TAGACACGCTGGAACAGGTTGC - 3' R: 5' – CTCCTCGTACAGCTTCACAGTC - 3'
FOXO4	F: 5' – CCGGAGAAGCGACTGACAC - 3' R: 5' – CGGATCGAGTTCCATCCTG - 3'
SULT1A1	F: 5' – CGGCACTACCTGGGTAAGC - 3' R: 5' – CACCCGCATGAAGATGGGAG- 3'

SULT1A3	F: 5’ – GGAACCCTCAGGGCTGGAG - 3’ R: 5’– CGTCCTTTGGGTTTCGGG - 3’

3.2.6. Статистически анализ

Анализът на промените в генната експресия беше извършен по метода 2^−ΔΔCt, като резултатите бяха представени като относителни единици mRNA (relative units, RU). Относителната експресия на таргетните гени беше определена чрез сравнение с нетретираните клетки (контрола, К), при които нивото на генната експресия условно беше прието за 1. Като ендогенни контролаи бяха използван гените за β-актин (*ACTB*) и RPLP0.

Всички проби бяха анализирани в три независими технически повторения, като за статистическия анализ бяха използвани средните стойности. Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната стойност (Mean ± SEM) за експресиите или средна стойност ± стандартно отклонение ((Mean ± SD) при МТТ теста. Корелационните анализи са извършени с GraphPad Prism 10.0 чрез корелационни матрици на Пиарсън, визуализация тип „топлинна карта“ (heatmap). Корелационните анализи бяха използвани за оценка на сходствата в профилите на генна експресия при различните експериментални условия. Различията между групите се приемаха за статистически значими при ниво на достоверност $p \leq 0,05$.

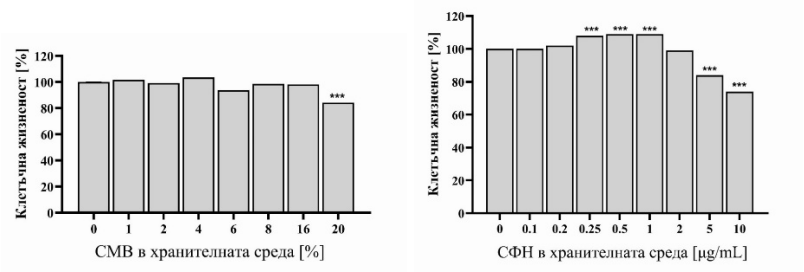
4 РЕЗУЛТАТИ

4.1 *Ефект на СМВ и СБАВ върху клетъчната жизненост*

Ефектът на СМВ и СБАВ върху клетъчната жизненост беше оценен чрез МТТ анализ. За нетоксични бяха приемани само концентрации, при които процентът на клетъчно оцеляване надвишаваше 80%. Въз основа на резултатите от МТТ анализа (фиг. 1 и 2) бяха подбрани три концентрации на СМВ и по три концентрации от всяко СБАВ за следващите експерименти.

Данните са представени като средна стойност ± SD от три независими експеримента; със съответно ниво на достоверност (p), спрямо контролата (нетретирани клетки).

Както е показано на фиг. 1, при най-високото съдържание на СМВ в хранителната среда (20%) беше установено рязко понижаване на клетъчната жизненост спрямо нетретираните клетки (p = 0,0003). Въпреки това, дори при тази концентрация клетъчната жизненост остана над прага от 80%. Концентрациите на СМВ в диапазона 1–16% не предизвикаха статистически значими промени в клетъчната жизненост. Получените резултати показват, че всички изследвани концентрации на СМВ са нетоксични за клетъчната линия HIEC-6. За последващите експерименти бяха избрани концентрации от 4%, 6% и 8%.

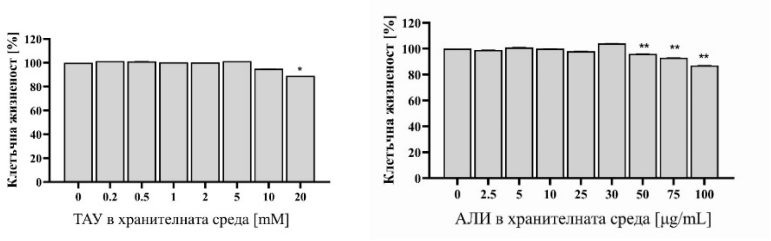


Фигура 1. *Ефект на СМВ (ляво) и СФН (дясно) върху жизнеността на HIEC-6 клетките, (***p ≤ 0,001, спрямо К)*

Интересно е, че СФН индуцира статистически значимо стимулиране на клетъчната пролиферация при концентрации 0,25, 0,5 и 1 μg/mL (фиг. 1 (дясно). При концентрация 5 μg/mL беше наблюдавано отчетливо понижение на клетъчната жизненост, а най-високата изследвана концентрация на СФН доведе до значително намаление на клетъчната жизненост до 74%, което позволява тя да бъде определена като цитотоксична (p < 0,001). Въз основа на тези резултати за последващите анализи бяха избрани концентрации от 0.5, 1 и 2 μg/mL.

Както е представено на фиг. 2 (ляво), концентрациите на ТАУ в диапазона 0.2–5 mM не оказаха съществено влияние върху клетъчната жизненост. Наблюдаваното леко понижаване на клетъчната жизненост при третиране с 10 mM ТАУ не достигна статистическа значимост (95%, p = 0,2). Статистически значимо намаление беше установено единствено при концентрация 20 mM (p = 0,03). Въпреки това и при тази концентрация клетъчната

жизненост остана висока (89%), което позволява да се приеме, че всички изследвани концентрации на ТАУ са нетоксични за HIEC-6 клетките. За последващите анализи бяха подбрани концентрации от 1, 2 и 5 mM.



***Фигура 2**. Ефект на ТАУ (ляво) и АЛИ (дясно) върху жизнеността на HIEC-6 клетките,*p ≤ 0,05; **p≤ 0,01 спрямо К.*

Както е показано на фиг. 2 (дясно), третирането с АЛИ доведе до статистически значимо намаление на клетъчната жизненост при трите най-високи изследвани концентрации. Особено показателно е, че при най-високата концентрация (100 μg/mL) клетъчната жизненост се доближи до праговата стойност от 80%. Въз основа на получените резултати за последващите експериментални анализи бяха избрани концентрации на АЛИ от 10, 25 и 30 μg/mL.

4.2 *Експресия на целеви гени в модел на ЛПЗ-индуцирано възпаление*

За да се изследва потенциалът на СМВ и СБАВ да модулират експресията на гени свързани с възпалителен отговор, регулация на редокс хомеостазата и ензими участващи в процесите на детоксикация, беше приложен модел на ЛПЗ-индуцирано възпаление. Клетките са третирани предварително в продължение на 24 часа със СМВ или СБАВ, след което бяха изложени на 1 μg/mL ЛПЗ. Някои от клетките бяха третирани със същата концентрация на ЛПЗ самостоятелно. Освен това, 3 mM салицилова киселина (СК) беше приложена като референтно вещество, известно със своите противовъзпалителни свойства. Както беше описано по-рано, клетките бяха третирани с три избрани концентрации от всяко изследвано съединение, в

съответствие с MTT анализа. Експериментални групи и условия на третиране на HIEC-6 клетките, съгласно дизайна на експеримента са следните: нетретирани клетки (К - контрола); ЛПЗ 1 μg/mL; СК - 3 mM; СМВ % (4, 6, 8); СФН μg/mL (0.5, 1, 2); АЛИ μg/mL (10, 25, 30); ТАУ mM (1, 2, 5).

Нивата на mRNA на NF-kB, TNF-α, IL-6, IL-8, COX-2, Casp1, IL-1β и IL1RN, Nrf-2, GPx, Sirt1, FOXO-4, SULT1A1 и SULT1A3 бяха сравнени с тези на нетретирани клетки.

Експресията на изследваните гени в човешки интестинални епителни клетки HIEC-6 беше анализирана при нестимулирани условия и след индуциране на възпаление с ЛПЗ. Нивата на иРНК на графиките са представени като относителни единици (RU), ЛПЗ +/-, клетки с/без ЛПЗ-индуцирано възпаление със съответното ниво на достоверност (p), спрямо контролата (нетретирани клетки).

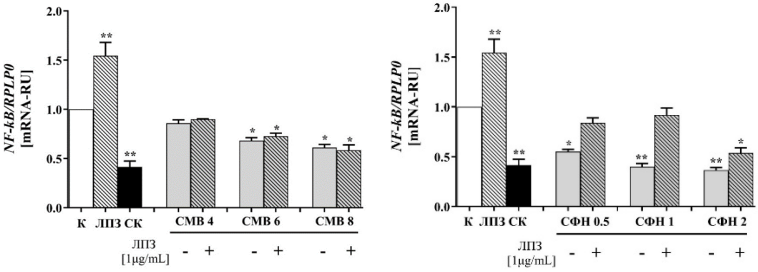
4.2.1 Ефект на СМВ и СБАВ върху експресията на NF-kB

Експресията на NF-κB в човешки интестинални епителни клетки HIEC-6 беше анализирана при базални условия и след индуциране на възпалителен отговор с ЛПЗ. Самостоятелното прилагане на ЛПЗ предизвика статистически значимо повишаване на относителната експресия на NF-κB спрямо нетретираните клетки, до 1,54 RU (p=0,01). За сравнение, СК доведе до статистически значимо понижение на експресията до 0,40 RU (p=0,006 спрямо нетретираните клетки) (фиг. 3 и 4).

Сред изследваните източници на сяра най-изразен ефект върху експресията на NF-κB беше установен при СМВ (фиг. 3). При 4% СМВ не се установи статистически значима промяна, докато при 6% и 8% експресията на NF-κB беше статистически значимо понижена както в нестимулирани, така и в ЛПЗ-стимулирани клетки. В нестимулираните клетки относителната експресия при 6% и 8% СМВ беше съответно 0,68 и 0,61 RU (p=0,03), а при ЛПЗ-стимулираните клетки – 0,72 RU (p=0,01) и 0,58 RU (p=0,04), съответно. По този начин при двете експериментални условия се наблюдава понижение на експресията с увеличаване на концентрацията на СМВ.

В обобщение, СМВ показва ясно изразен потискащ ефект върху експресията на NF-κB, който се проявява при 6% и 8% и се

запазва, както при базални, така и при ЛПЗ-стимулирани условия.



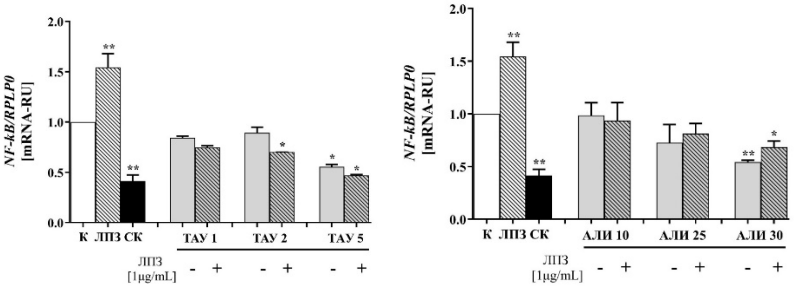
Фигура 3. *Ефект на СМВ (ляво) и СФН (дясно) върху експресията на NF-kB в HIEC-6, (*p ≤ 0,05; **p≤ 0,01, спрямо К).*

Третирането със СФН също понижи експресията на NF-κB, като ефектът беше отчетлив при всички изследвани концентрации в нестимулирани клетки (фиг. 3 дясно). Относителната експресия при 0,5, 1 и 2 μg/mL беше съответно 0,55 RU (p=0,05), 0,39 RU (p=0,009) и 0,36 RU (p=0,05). При ЛПЗ-стимулираните клетки статистически значимо понижение беше установено при най-високата концентрация от 2 μg/mL, при която експресията достигна 0,53 RU (p=0,05 спрямо нетретираните клетки).

В обобщение, СФН понижава експресията на NF-κB при всички изследвани концентрации в нестимулирани клетки, докато при ЛПЗ-стимулирани клетки ефектът е установен само при 2 μg/mL.

При ТАУ се наблюдава по-ограничен и зависим от експерименталното условие ефект (фиг. 4 ляво). Статистически значимо понижение на експресията беше установено при 2 mM единствено в ЛПЗ-стимулирани клетки, при които стойността достигна 0,70 RU (p=0,03). При най-високата концентрация от 5 mM експресията беше статистически значимо понижена както в нестимулирани клетки – до 0,55 RU (p=0,005), така и в ЛПЗ-стимулирани клетки – до 0,46 RU (p=0,002).

В обобщение, ТАУ понижава експресията на NF-κB най-ясно при 5 mM, при която ефектът се наблюдава и при двете експериментални условия, докато при 2 mM е установен само при ЛПЗ-стимулирани клетки.).



Фигура 4. *Ефект на ТАУ (ляво) и АЛИ (дясно) върху експресията на NF-kB в HIEC-6, (*p ≤ 0,05; **p≤ 0,01 спрямо К).*

В сравнение с останалите третирания, АЛИ повлиява експресията на NF-κB само при най-високата изследвана концентрация (фиг. 4 дясно). При 10 и 25 μg/mL не се установиха статистически значими промени. При 30 μg/mL обаче експресията беше статистически значимо понижена както в нестимулирани клетки – до 0,54 RU (p=0,006), така и в ЛПЗ-стимулирани клетки – до 0,68 RU (p=0,02).

В обобщение, АЛИ показва потискащ ефект върху експресията на NF-κB, ограничен до най-високата изследвана концентрация от 30 μg/mL, при която промяната се запазва и при двете експериментални условия.

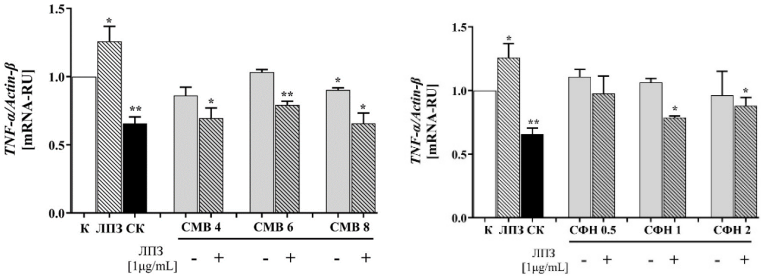
Обобщено, и четирите изследвани източника на сяра показват понижение на експресията на NF-κB, но се различават по концентрационния диапазон и по зависимостта на ефекта от наличието на ЛПЗ. Най-широко изразен ефект се наблюдава при СМВ, докато при СФН, ТАУ и АЛИ статистически значимото понижение е ограничено до определени концентрации и/или експериментални условия.

4.2.2 Ефект на СМВ и СБАВ върху експресията на TNF-α

Резултатите за ефекта на изследваните източници на сяра върху експресията на TNF-α са представени на фигури 5 и 6. TNF-α е провъзпалителен цитокин, чиято експресия се регулира, наред с други фактори, от NF-κB-зависима сигнализация.

При клетките, третирани само с ЛПЗ, експресията на TNF-α беше статистически значимо повишена спрямо нетретираните контролни клетки (p=0,02). СК, използвана като референтно третиране, доведе до статистически значимо понижение на експресията до 0,65 RU спрямо нетретираните клетки (p=0,0047).

При СМВ беше установен най-изразен ефект върху експресията на TNF-α (фиг. 5 ляво). В ЛПЗ-стимулираните клетки и трите изследвани концентрации – 4%, 6% и 8% – доведоха до статистически значимо понижение на експресията, съответно при p=0,011, p=0,007 и p=0,05. В нестимулирани клетки промяна в експресията беше установена само при най-високата концентрация от 8%, при която нивото достигна 0,90 RU спрямо нетретираните клетки (p=0,05).



Фигура 5. *Ефект на СМВ (ляво) и СФН (дясно) върху експресията на TNF-α в HIEC-6, (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01 спрямо К).*

В обобщение, СМВ показва добре изразен ефект върху експресията на TNF-α, като потискането се наблюдава при всички изследвани концентрации в ЛПЗ-стимулирани клетки, докато при нестимулирани клетки е установено само при 8% СМВ.

При СФН статистически значимо понижение на експресията на TNF-α в ЛПЗ-стимулирани клетки беше установено при 1 и 2 μg/mL (фиг. 5 дясно). Относителната експресия при тези концентрации беше съответно 0,78 RU (p=0,04) и 0,87 RU (p=0,017). При 0,5 μg/mL не се установи статистически значима промяна, като нивото на иРНК остава съизмеримо с това при нетретираните контроли.

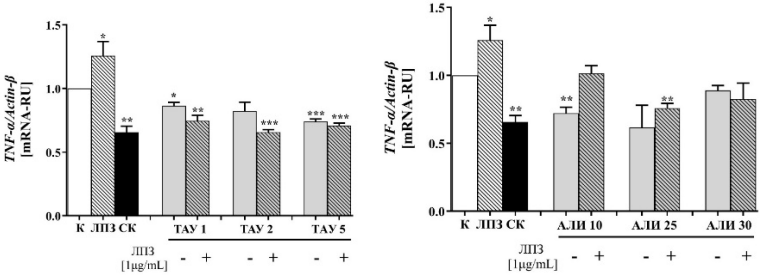
В обобщение, СФН понижава експресията на TNF-α в ЛПЗ-стимулирани клетки при 1 и 2 μg/mL, докато най-ниската изследвана концентрация не оказва статистически значим ефект

ТАУ показа по-широк ефект върху експресията на TNF-α, който се проявява както в нестимулирани, така и в ЛПЗ-стимулирани клетки (фиг. 6 ляво). В нестимулирани клетки статистически значимо понижение беше установено при 1 и 5 mM ТАУ. При 2 mM се наблюдава понижение на експресията до 0,82 RU, но без статистическа значимост. При ЛПЗ-стимулирани клетки и трите концентрации доведоха до статистически значимо понижение на експресията. При 1 mM относителната експресия беше 0,74 RU (p=0,028), а при 2 и 5 mM – съответно 0,65 RU (p=0,001) и 0,70 RU (p=0,001).

В обобщение, ТАУ показва потискащ ефект върху експресията на TNF-α и в двете експериментални условия, като при ЛПЗ-стимулираните клетки ефектът е установен при всички изследвани концентрации.

При АЛИ ефектът върху експресията на TNF-α беше по-ограничен и зависеше от експерименталното условие (фиг. 6 дясно). В нестимулирани клетки статистически значимо понижение беше установено при 10 μg/mL, при което относителната експресия достигна 0,70 RU (p=0,002). При ЛПЗ-стимулирани клетки статистически значим ефект беше установен единствено при 25 μg/mL, при която експресията беше понижена до 0,75 RU (p=0,003).

В обобщение, АЛИ понижава експресията на TNF-α при различни концентрации в зависимост от експерименталното условие – при 10 μg/mL в нестимулирани и при 25 μg/mL в ЛПЗ-стимулирани клетки



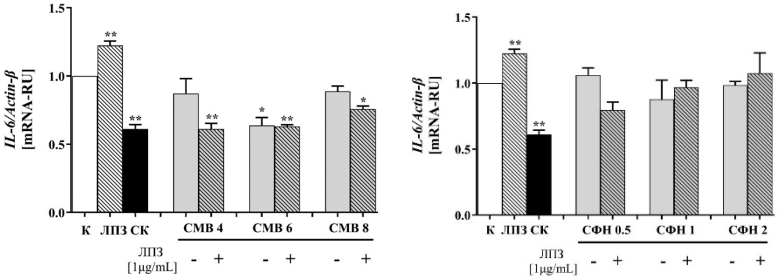
Фигура 6. *Ефект на ТАУ (ляво) и АЛИ (дясно) върху експресията на TNF-α в HIEC-6, (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001 спрямо К).*

В обобщение, и четирите изследвани източника на сяра понижиха експресията на TNF-α, но с различен профил в зависимост от концентрацията и експерименталното условие. Най-широко изразен ефект се наблюдава при СМВ и ТАУ, докато при СФН и АЛИ промяната е ограничена до определени концентрации и условия.).

4.2.3 Ефект на СМВ и СБАВ върху експресията на гена за IL-6

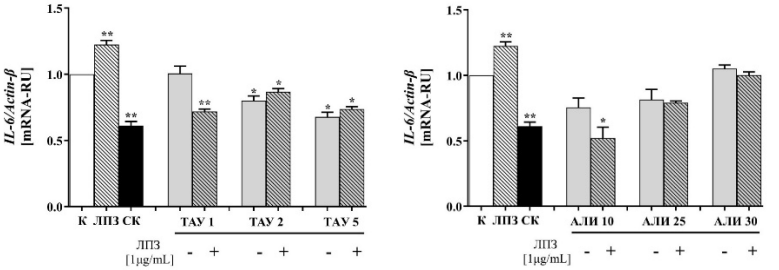
Изследвахме ефекта на СМВ и СБАВ върху експресията на IL-6 в HIEC-6, в условията на ЛПЗ-индуцирано възпаление и в нестимулирани клетки (фиг. 13-16). Самостоятелно прилагане на ЛПЗ значително стимулира експресията на гена до ниво 1,22 RU (p=0,003), докато СК потисна експресията на гена за този цитокин до 0,61 (p=0,006).

Най-изразен инхибиращ ефект върху експресията на този ген беше установен за СМВ и ТАУ, като този ефект е силно изразен в условията на индуцирано възпаление (фиг. 7 и 8 съответно). Както може да се види на фигура 7, и трите приложени концентрации на СМВ оказват статистически значим ефект в клетките с индуцирано възпаление като нивата на промяна в експресията бяха съответно 0,61 (p=0,007) в клетките третирани с 4% СМВ, и 0,63 (p=0,001) и 0,75 (p=0,04) за двете по-високи концентрации съответно. Единствено 6% съдържание на СМВ в хранителната среда оказа ефект върху експресията на IL-6 в клетките с непроменена хомеостаза (p=0,017).



***Фигура** 7. Ефект на СМВ (ляво) и СФН (дясно) върху експресията на IL-6 в HIEC-6, (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01 спрямо К).*

Изненадващо, за нито една от приложените концентрации СФН не беше установен статистически значим ефект върху експресията на гена за IL-6, нито в ЛПЗ-стимулирани клетки, нито в отсъствие на възпаление (фиг. 7 дясно).



***Фигура 8.** Ефект на ТАУ (ляво) и АЛИ (дясно) върху експресията на IL-6 в HIEC-6, (*p ≤ 0,05 и **p ≤ 0,01, спрямо К)*

От резултатите представени на фигура 8 се вижда, че ТАУ, подобно на СМВ, проявява противовъзпалителен потенциал, като инхибира икспресията с всички приложени концентрации в условия на възпаление. Такъв ефект на ТАУ се отчита и в нестимулирани клетки, третирани с двете по-високи

кнцентрации, 2 и 5mM, с промяна в експресията съответно 0,79 (p=0,002) и 0,67 (p= 0,03).

В клетките третирани с АЛИ, ефект беше отчетен само при тези, третирани с най-ниската концентрация – 10 μg/ml, в условията на възпаление. В тази група клетки, експресията на гена беше статистически значимо потисната до 0,52 (p=0,03 спрямо нетретираните клетки) (фиг. 8 дясно)

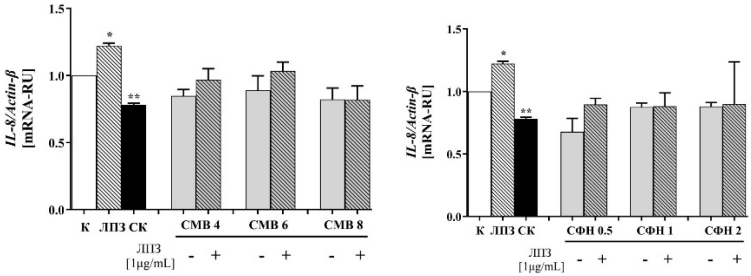
В обобщение, и четирите изследвани източника на сяра понижават експресията на IL-6, но с различна степен и зависимост от концентрацията и експерименталното условие. Най-широко изразен ефект се наблюдава при СМВ и ТАУ, които променят експресията на IL-6 при всички изследвани концентрации в условия на ЛПЗ-стимулация. При АЛИ ефектът е ограничен до най-ниската концентрация и само при ЛПЗ-стимулирани клетки, докато при СФН не са установени статистически значими промени

4.2.4 Ефект на СМВ и СБАВ върху експресията на IL-8

Интерлевкин-8 е провъзпалителен хемокин, експресиран от различни тъкани и клетъчни типове, който участва в привличането и активирането на неутрофили в условия на възпаление. Експресията на IL-8 е тясно свързана с регулацията на възпалителния отговор и с NF-κB-сигналния път.

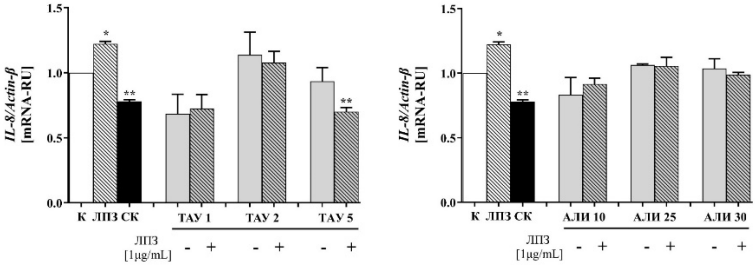
На фигури 9 и 10 са представени резултатите от ефекта на изследваните източници на сяра върху експресията на IL-8 в нестимулирани клетки и в условия на ЛПЗ-индуцирано възпаление. Третирането с ЛПЗ повишава експресията на IL-8 до 1,23 RU (p=0,05), докато СК я понижава статистически значимо до 0,78 RU (p=0,04).

При СМВ, СФН и АЛИ не са установени статистически значими промени в експресията на IL-8 в сравнение със съответните контроли, както в нестимулирани, така и в ЛПЗ-стимулирани клетки. При някои концентрации се наблюдават тенденции към понижаване на експресията, но те не достигат статистическа значимост.



Фигура 9. *Ефект на СМВ (ляво) и СФН (дясно) върху експресията на IL-8 в HIEC-6, (*p ≤ 0,05 и **p ≤ 0,01, спрямо К)*

От четирите изследвани източника на сяра, статистически значимо понижение на експресията на IL-8 е установено единствено при ТАУ. Ефектът е ограничен до най-високата изследвана концентрация (5 mM) и се наблюдава само в ЛПЗ-стимулирани клетки, при които експресията се понижава до 0,70 RU (p=0,009) (фиг. 10 ляво).



Фигура 10. *Ефект на ТАУ (ляво) и АЛИ (дясно) върху експресията на IL-8 в HIEC-6, (*p ≤ 0,05 и **p ≤ 0,01, спрямо К)*

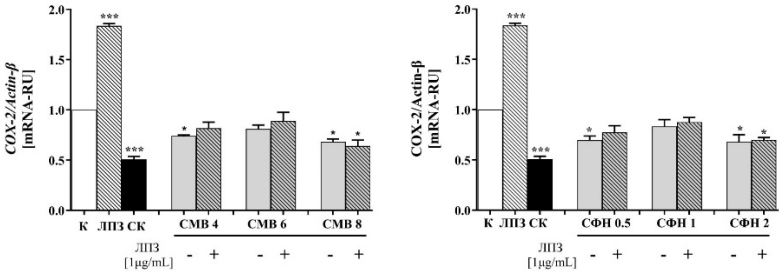
В обобщение, експресията на IL-8 показва ограничена чувствителност към изследваните третирания в сравнение с някои от останалите анализирани провъзпалителни гени. СМВ, СФН и АЛИ не предизвикват статистически значими промени,

докато ТАУ понижава експресията само при най-високата концентрация и в условия на ЛПЗ-индуцирано възпаление.

4.2.5 Ефект на СМВ и СБАВ върху експресията на COX-2

COX-2 е индуцируем ензим, свързан с възпалителния отговор, чиято генна експресия може да бъде регулирана от NF-κB-зависими сигнални механизми. В настоящото изследване е оценено влиянието на изследваните източници на сяра върху експресията на COX-2 в нестимулирани и ЛПЗ-стимулирани HIEC-6 клетки (фиг. 11 и 12).

В ЛПЗ-стимулираните клетки експресията на COX-2 е повишена 1,8 пъти спрямо нетретираните клетки (p=0,0003), докато салициловата киселина (СК) я понижава статистически значимо до 0,51 RU (p=0,0003).

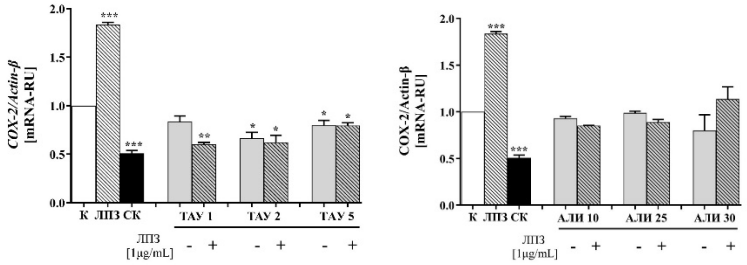


***Фигура 11**. Ефект на СМВ (ляво) и СФН (дясно) върху експресията на COX-2 в HIEC-6, (*p ≤ 0,05; ***p ≤ 0,001 спрямо К).*

При СМВ най-ниската изследвана концентрация (4%) понижава статистически значимо експресията на COX-2 в нестимулирани клетки (p=0,05). При най-високата концентрация (8%) е установено статистически значимо понижение на експресията както в нестимулирани, така и в ЛПЗ-стимулирани клетки – съответно до 0,68 RU (p=0,05) и 0,64 RU (p=0,03). При междинната концентрация не е посочена статистически значима промяна. По този начин ефектът на СМВ се характеризира с понижение на експресията при ниската и високата концентрация, като промяната не показва последователна линейна зависимост от концентрацията (фиг. 11 ляво).

СФН показва сходен, но по-ограничен профил на действие (фиг. 11 дясно). Най-високата концентрация (2 μg/mL) понижава статистически значимо експресията на COX-2 както в нестимулирани, така и в ЛПЗ-стимулирани клетки (съответно p=0,04 и p=0,037). В нестимулирани клетки статистически значимо понижение е установено и при най-ниската концентрация (0,5 μg/mL; p=0,05). За междинната концентрация не е установена статистически значима промяна.

Най-широко изразен ефект върху експресията на COX-2 сред изследваните източници на сяра показва ТАУ (фиг. 12 ляво). При концентрация 2 mM експресията е понижена статистически значимо както в нестимулирани клетки – до 0,66 RU (p=0,02), така и в ЛПЗ-стимулирани клетки – до 0,62 RU (p=0,03). При 5 mM експресията се понижава до 0,79 RU и при двете експериментални условия, като промяната е статистически значима, както в нестимулирани клетки (p=0,04), така и в ЛПЗ-стимулирани клетки (p=0,02). Най-ниската концентрация (1 mM) води до статистически значимо понижение само в ЛПЗ-стимулирани клетки (p=0,002). В нестимулирани клетки при тази концентрация също се наблюдава понижение на експресията до 0,83 RU, но без статистическа значимост.



***Фигура 12**. Ефект на ТАУ (ляво) и АЛИ (дясно) върху експресията на COX-2 в HIEC-6, (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001 спрямо К).*

За разлика от СМВ, СФН и ТАУ, при нито една от приложените концентрации на АЛИ не е установена

статистически значима промяна в експресията на COX-2 в сравнение със съответните контроли (фиг. 12 дясно).

В обобщение, СМВ, СФН и ТАУ понижават експресията на COX-2 при определени концентрации и експериментални условия, докато при АЛИ не са установени статистически значими промени. Най-добре изразен инхибиторен ефект върху експресията на COX-2 се наблюдава при третиране сТАУ, като този ефект е установен при трите концентрации, в поне едно от изследваните условия.

4.2.6 Ефект на СМВ и СБАВ върху експресията на CASP1

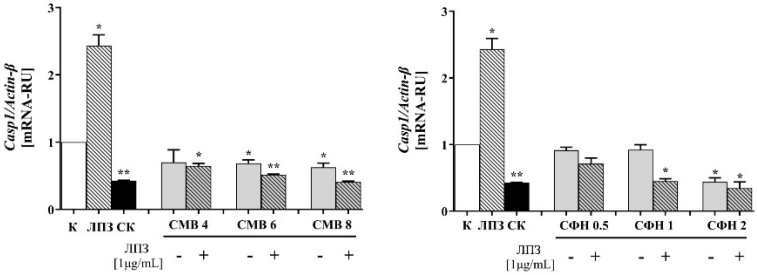
Каспаза-1 е компонент на инфламазомния отговор, свързан с процеси, участващи в узряването на IL-1β и регулирането на възпалителния отговор. В настоящото изследване е оценено влиянието на изследваните източници на сяра върху експресията на CASP1 в нестимулирани и ЛПЗ-стимулирани HIEC-6 клетки (фиг. 25–28).

Третирането с ЛПЗ повишава статистически значимо експресията на CASP1 до 2,34 RU (p=0,04) спрямо нетретираните клетки, докато СК я понижава до 0,42 RU (p=0,009).

При СМВ е установено статистически значимо понижение на експресията на CASP1 при всички изследвани концентрации, като при 4% ефектът е наблюдаван само в ЛПЗ-стимулирани клетки (p=0,012) (фиг. 13 ляво). При 6% СМВ експресията се понижава до 0,68 RU (p=0,03) в нестимулирани и до 0,50 RU (p=0,002) в ЛПЗ-стимулирани клетки. При 8% СМВ е установено понижение съответно до 0,60 RU (p=0,03) и 0,40 RU (p=0,005) в нестимулирани и ЛПЗ-стимулирани клетки. Тези резултати показват, че СМВ показва добре изразен ефект върху експресията на CASP1, обхващащ всички изследвани концентрации и двете експериментални условия, като при 4% промяната е статистически значима само при ЛПЗ-стимулация.

Третирането със СФН доведе до статистически значимо понижение на експресията на CASP1, установено при концентрации 1 и 2 μg/mL (фиг. 13 дясно). При 1 μg/mL ефектът е наблюдаван само в ЛПЗ-стимулирани клетки, при които експресията се понижава до 0,40 RU (p=0,02). При 2 μg/mL е установено понижение както в нестимулирани, така и в ЛПЗ-стимулирани клетки, съответно до 0,40 RU (p=0,02) и 0,30 RU

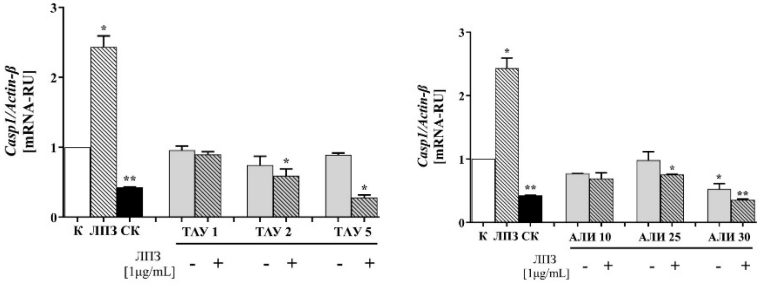
(p=0,022). При най-ниската концентрация не е установена статистически значима промяна. Следователно, в рамките на изследваните условия ефектът на СФН е по-изразен при по-високите концентрации, но наличните данни не позволяват категорично определяне на концентрационно-зависима закономерност.



Фигура 13. *Ефект на СМВ (ляво) и СФН (дясно) върху експресията на CASP1 в HIEC-6, (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01 спрямо К).*

При ТАУ статистически значимо понижение на експресията на CASP1 е установено само в ЛПЗ-стимулирани клетки при концентрации 2 и 5 mM (фиг. 14 ляво). Експресията се понижава съответно до 0,59 RU (p=0,05) и 0,30 RU (p=0,03). При останалите условия и концентрации не са установени статистически значими промени.

Ефектът на АЛИ върху експресията на CASP1 е представен на фигура 14 дясно. Подобно на СФН, най-високата концентрация от 30 μg/mL значително потиснa експресията на гена, както в нестимулирани клетки, така и при индуцирано възпаление. Отчетените нива на експресия при двете експериментални условия бяха съответно 0,52 RU (p=0,04) и 0,35 RU (p=0,0014). Средната концентрация АЛИ от 25 μg/mL също статистически значимо потисна експресията, но само в нестимулирани клетки (0,75 RU, p=0.05 спрямо контролите).



Фигура 14. *Ефект на ТАУ (ляво) и АЛИ (дясно) върху експресията на CASP1 в HIEC-6 (*p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, спрямо К).*

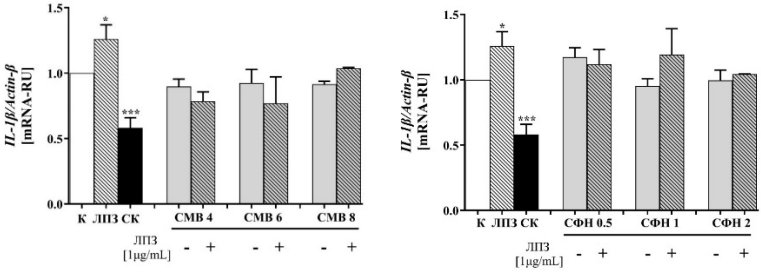
В обобщение, и четирите изследвани източника на сяра понижават експресията на CASP1 при определени концентрации и експериментални условия, като промените са по-широко представени при ЛПЗ-стимулираните клетки. Най-широк и последователен профил се наблюдава при СМВ, при която статистически значимо понижение е установено при всички изследвани концентрации, докато при СФН, ТАУ и АЛИ ефектът е ограничен до определени концентрации и условия.

4.2.7 Ефект на СМВ и СБАВ върху експресията на IL-1β

IL-1β е ключов провъзпалителен цитокин, чиято експресия е свързана с NF-κB-зависима сигнализация и с инфламазомния отговор.

Ефектът на изследваните източници на сяра върху експресията на IL-1β е представен на фигури 15 и 16. Подобно на наблюдаваното при други провъзпалителни гени, третирането с ЛПЗ води до статистически значимо повишение на експресията на IL-1β до 1,25 RU (p=0,03), докато при третираните със СК клетки експресията е статистически значимо понижена до 0,58 RU (p<0,001) спрямо съответните контроли.

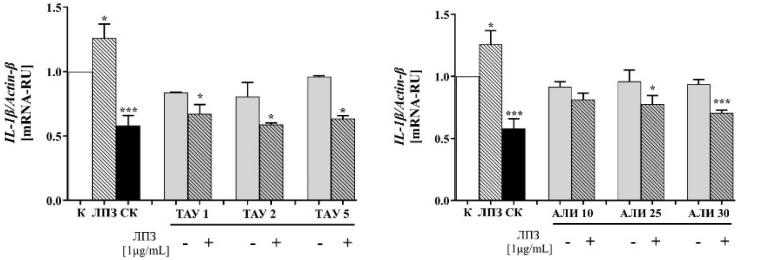
При СМВ не е установена статистически значима промяна в експресията на IL-1β нито в нестимулирани, нито в ЛПЗ-стимулирани клетки (фиг. 15 ляво).



***Фигура 15**. Ефект на СМВ (ляво) и СФН (дясно) върху експресията на IL-1β в HIEC-6, (*p ≤ 0,05; ***p ≤ 0,001 спрямо К).*

При третирането със СФН също не са установени статистически значими промени в експресията на IL-1β при нито една от изследваните концентрации и в нито едно от двете експериментални условия (фиг. 15 дясно).

Най-добре изразен ефект върху експресията на IL-1β е установен при клетките третирани с ТАУ (фиг. 16 ляво). И трите изследвани концентрации – 1, 2 и 5 mM – водят до статистически значимо понижение на експресията, но само в ЛПЗ-стимулирани клетки. Нивата на експресия са съответно 0,67 RU (p=0,05), 0,58 RU (p=0,02) и 0,63 RU (p=0,036). В нестимулирани клетки не са установени статистически значими промени).



***Фигура 16**. Ефект на ТАУ (ляво) и АЛИ (дясно) върху експресията на IL-1β в HIEC-6, (*p ≤ 0,05; ***p ≤ 0,001 спрямо К).*

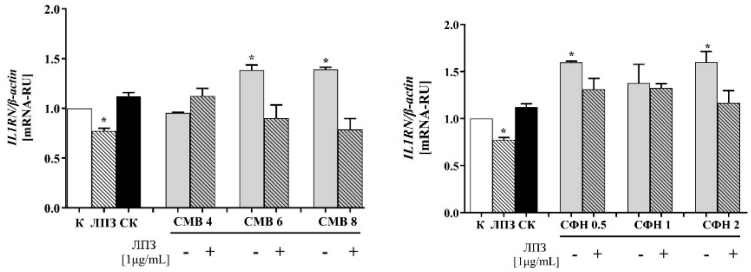
Третирането с АЛИ статистически значимо понижи на експресията на IL-1β с концентрации 25 и 30 μg/mL, като ефектът също е ограничен до ЛПЗ-стимулирани клетки. Експресията се понижава съответно до 0,77 RU (p=0,05) и 0,70 RU (p=0,01). В нестимулирани клетки не са установени статистически значими промени при изследваните концентрации (фиг. 16 дясно).

В обобщение, СМВ и СФН не предизвикват статистически значими промени в експресията на IL-1β при изследваните условия. ТАУ показва най-изразен ефект, като понижава експресията и при трите концентрации, но само в ЛПЗ-стимулирани клетки. При АЛИ понижение на експресията е установено при средната и най-високата концентрация, също ограничено до условията на ЛПЗ-стимулация. Така от изследваните третирания ТАУ и АЛИ показват най-ясно изразени промени в експресията на IL-1β, докато при СМВ и СФН не са установени статистически значими промени.

4.2.8 Ефект на СМВ и СБАВ върху експресията на IL1RN

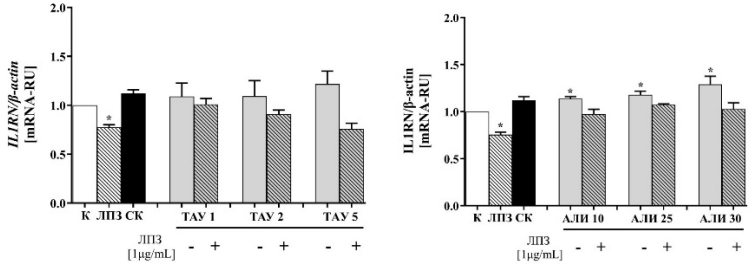
Ефектите на изследваните източници на сяра върху експресията на гена IL1RN са представени на фигури 17 и 18. В клетките, третирани само с ЛПЗ, беше установено статистически значимо понижение на нивото на иРНК на IL1RN до 0,77 RU (p=0,02) спрямо нетретираните клетки. Прилагането на СК не доведе до статистически значима промяна в експресията на IL1RN, като нивата на иРНК останаха съизмерими с тези в нетретираните клетки.

Фигура 17 (ляво) представя резултатите от третирането със СМВ. В нестимулирани клетки 6% и 8% СМВ доведоха до статистически значимо повишение на експресията на IL1RN, съответно до 1,38 RU (p=0,05) и 1,39 RU (p=0,03). В ЛПЗ-стимулираните клетки не беше установена статистически значима промяна в експресията на гена при нито една от изследваните концентрации на СМВ.



Фигура 17. *Ефект на СМВ (ляво) и СФН (дясно) върху експресията на IL1RN в HIEC-6, (*p ≤ 0,05; спрямо К).*

Подобен профил беше установен и при СФН (фиг. 17 дясно). В нестимулирани клетки 0,5 и 2 μg/mL СФН доведоха до статистически значимо повишение на експресията на IL1RN, съответно до 1,59 RU (p=0,03) и 1,60 RU (p=0,05). При концентрация 1 μg/mL не беше установена статистически значима промяна. В ЛПЗ-стимулираните клетки СФН не доведе до статистически значима промяна в експресията на IL1RN при нито една от приложените концентрации.).



Фигура 18*. Ефект на ТАУ (ляво) и АЛИ (дясно) върху експресията на IL1RN в HIEC-6, (*p ≤ 0,05; спрямо К).*

За разлика от останалите изследвани източници на сяра, при ТАУ не беше установена статистически значима промяна в експресията на IL1RN при нито една от приложените концентрации и при нито едно от експерименталните условия (фиг. 18 ляво). В ЛПЗ-стимулирани клетки беше наблюдавана тенденция към понижение на експресията до 0,84 RU при 5 mM

ТАУ, но промяната не достигна статистическа значимост (p=0,20).

При АЛИ беше установен по-изразен профил на промени в експресията на IL1RN (фиг. 18). И трите изследвани концентрации доведоха до статистически значимо повишение на експресията в нестимулирани клетки: до 1,13 RU при 10 µg/mL (p=0,03), 1,17 RU при 25 µg/mL (p=0,02) и 1,29 RU при 30 µg/mL (p=0,04). В ЛПЗ-стимулираните клетки не беше установена статистически значима промяна при нито една от приложените концентрации. Въпреки постепенното повишение на средните нива на експресия с увеличаване на концентрацията, получените данни не са достатъчни за категорично определяне на концентрационно-зависима зависимост.

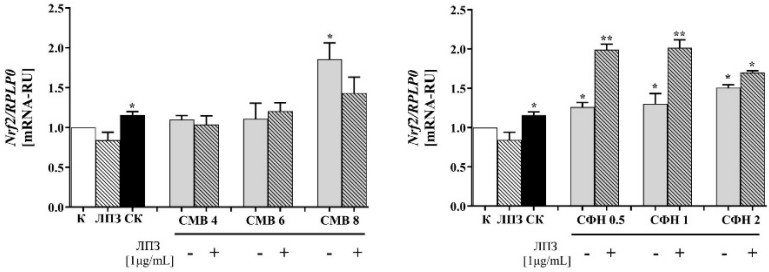
В обобщение, СМВ, СФН и АЛИ повишават експресията на IL1RN в нестимулирани клетки, но с различен профил по отношение на концентрациите. Най-широко представен е ефектът на АЛИ, при който и трите приложени концентрации водят до статистически значимо повишение, докато при СМВ и СФН промяната се установява само при определени концентрации. При ЛПЗ-стимулирани клетки нито един от четирите изследвани източника на сяра не предизвиква статистически значима промяна в експресията на IL1RN. При ТАУ не е установен статистически значим ефект при нито едно от изследваните условия.

4.2.9 Ефект на СМВ и СБАВ върху експресията на NRF2

Ефектите на изследваните източници на сяра върху експресията на Nrf2 са представени на фигури 37–40. Прилагането на ЛПЗ самостоятелно не доведе до статистически значима промяна в експресията на гена в сравнение с нетретираните клетки. За разлика от това, СК доведе до статистически значимо повишение на експресията до 1,15 RU (p=0,04).

При третиране със СМВ статистически значимо повишение на експресията на Nrf2 беше установено само при най-високата концентрация от 8%, като нивото на експресия достигна 1,85 RU (p=0,05) (фиг. 19 ляво). Този ефект беше наблюдаван единствено в нестимулирани клетки. В ЛПЗ-стимулираните клетки не беше установена статистически

значима промяна в експресията на Nrf2 при нито една от приложените концентрации на СМВ.

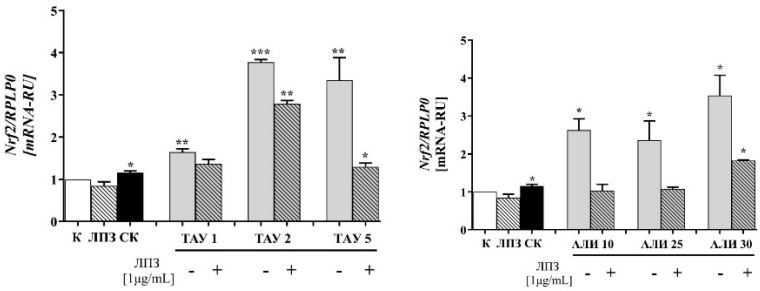


***Фигура 19**. Ефект на СМВ (ляво) и СФН (дясно) върху експресията на Nrf2 в HIEC-6, (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01, спрямо К).*

Третирането със СФН доведе до статистически значимо повишение на експресията на Nrf2 при всички изследвани концентрации както в нестимулирани, така и в ЛПЗ-стимулирани клетки (фиг. 19 дясно). При концентрация 0,5 μg/mL нивото на експресия достигна 1,26 RU (p=0,02) в нестимулирани клетки и 1,88 RU (p=0,006) в ЛПЗ-стимулирани клетки. При 1 μg/mL съответните стойности бяха 1,30 RU (p=0,05) и 2,00 RU (p=0,002), а при 2 μg/mL – 1,50 RU (p=0,02) и 1,69 RU (p=0,012). По-високи нива на експресия спрямо съответните контроли се наблюдаваха и в двете експериментални условия, като статистически значими промени бяха установени при всички приложени концентрации.

В клетките третирани с ТАУ също беше установено статистически значимо повишение на експресията на Nrf2 (фиг. 20 ляво). В нестимулирани клетки всички приложени концентрации доведоха до повишение на експресията, докато в ЛПЗ-стимулирани клетки статистически значим ефект беше установен при двете по-високи концентрации. При 1 mM ТАУ експресията в нестимулирани клетки се повиши до 1,64 RU (p=0,007). При 2 mM ТАУ беше отчетено най-високото ниво на експресия в нестимулирани клетки – 3,70 RU (p<0,001), а в ЛПЗ-стимулирани клетки – 2,80 RU (p<0,001). При 5 mM ТАУ съответните стойности бяха 3,30 RU (p=0,01) и 1,29 RU (p=0,05).

Получените данни показват различен по големина ефект при отделните концентрации, без да се установява еднопосочна концентрационно-зависима тенденция.



Фигура 20. *Ефект на ТАУ (ляво) и АЛИ (дясно) върху експресията на Nrf2 в HIEC-6, (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001 спрямо К).*

АЛИ също доведе до статистически значимо повишение на експресията на Nrf2, което беше установено предимно в нестимулирани клетки (фиг. 20 дясно). При 10 μg/mL експресията се повиши до 2,62 RU (p=0,012), при 25 μg/mL – до 2,36 RU (p=0,04), а при 30 μg/mL – до 3,53 RU (p=0,05). При най-високата концентрация от 30 μg/mL статистически значимо повишение беше установено и в ЛПЗ-стимулирани клетки, където нивото на експресия достигна 1,80 RU (p=0,014). При останалите концентрации не беше установена статистически значима промяна в условията на ЛПЗ-индуцирано възпаление.

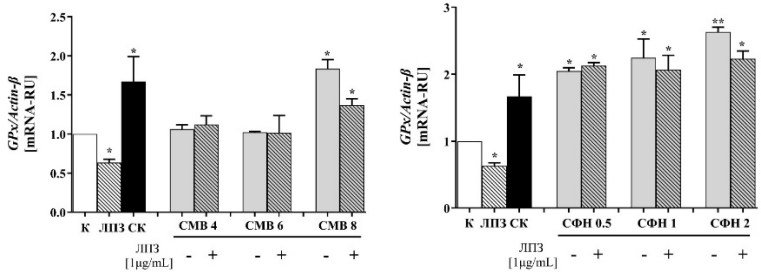
В обобщение, всички изследвани източници на сяра показаха способност да повишават експресията на Nrf2 при определени експериментални условия, но с различен профил. СФН се характеризира с най-последователен ефект, тъй като при всички изследвани концентрации беше установено статистически значимо повишение на експресията, както в нестимулирани, така и в ЛПЗ-стимулирани клетки. При ТАУ ефектът беше широко изразен в нестимулирани клетки и при двете по-високи концентрации в условията на ЛПЗ-индуцирано възпаление. АЛИ повиши експресията преимуществено в нестимулирани клетки,

като ефект в ЛПЗ-стимулирани клетки беше установен само при най-високата концентрация. При СМВ промяна беше установена единствено при 8% и само в нестимулирани клетки.

4.2.10 Ефект на СМВ и СБАВ върху експресията на GPx

Глутатионпероксидазата е ензим, свързан с клетъчната антиоксидантна защита. Резултатите от изследването на ефектите на природните източници на сяра върху експресията на GPx са представени на фигури 21 и 22. Самостоятелното прилагане на ЛПЗ доведе до статистически значимо понижение на експресията на гена до 0,63 RU (p=0,05) спрямо нетретираните клетки, докато прилагането на СК доведе до статистически значимо повишение на експресията до 1,66 RU (p=0,05).

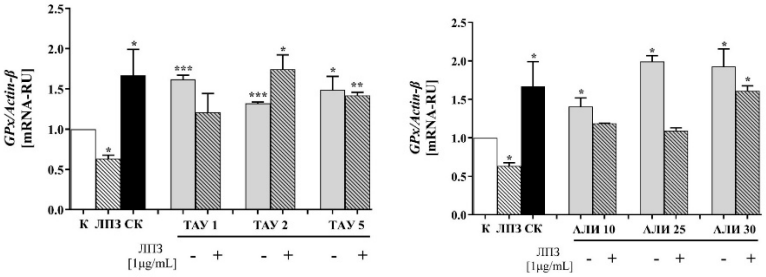
Всички изследвани природни източници на сяра показаха повишение на експресията на GPx, но с различна степен и при различен профил на действие в зависимост от концентрацията и експерименталното условие.



Фигура 21. *Ефект на СМВ (ляво) и СФН (дясно) върху експресията на GPx в HIEC-6, (*p ≤ 0,05; спрямо К).*

При СМВ статистически значимо повишение на експресията на GPx беше установено при най-високата изследвана концентрация от 8%, както в нестимулирани, така и в ЛПЗ-стимулирани клетки (фиг. 21). В нестимулирани клетки нивото на експресия достигна 1,83 RU (p=0,03), а в условията на ЛПЗ-индуцирано възпаление – 1,36 RU (p=0,015). При останалите изследвани концентрации не беше установена статистически значима промяна в експресията на GPx.

Най-последователен профил на повишение на експресията беше установен при СФН и ТАУ, при които статистически значими промени се наблюдаваха при всички приложени концентрации в поне едно от експерименталните условия (фиг. 21 и 22).



Фигура 22. *Ефект на ТАУ (ляво) и АЛИ (дясно) върху експресията на GPx в HIEC-6, (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01 и ***p ≤ 0,001 спрямо К).*

АЛИ също доведе до повишение на експресията на GPx, но ефектът беше по-широко изразен в нестимулирани клетки (фиг. 22). При 10 μg/mL нивото на експресия достигна 1,40 RU (p=0,05), при 25 μg/mL – 2,00 RU (p=0,018), а при 30 μg/mL – 1,91 RU (p=0,04). В ЛПЗ-стимулирани клетки статистически значимо повишение на експресията беше установено само при най-високата концентрация от 30 μg/mL (p=0,04). Точната стойност на промяната в тази група не е посочена в предоставените данни.

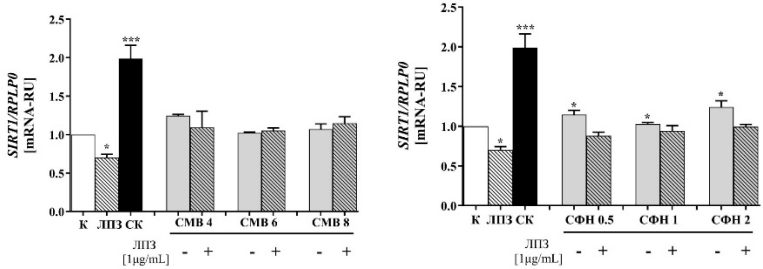
В обобщение, всички изследвани природни източници на сяра показаха повишение на експресията на GPx при определени експериментални условия, но с различен профил. СФН се характеризира с най-последователен ефект, като и трите концентрации доведоха до статистически значимо повишение на експресията, както в нестимулирани, така и в ЛПЗ-стимулирани клетки. При ТАУ статистически значимо повишение беше установено при всички концентрации в нестимулирани клетки и при двете по-високи концентрации в ЛПЗ-стимулирани клетки. При СМВ ефектът беше ограничен до най-високата концентрация, но се прояви и при двете експериментални

условия. При АЛИ повишение на експресията беше установено при всички концентрации в нестимулирани клетки, докато при ЛПЗ-стимулирани клетки промяната достигна статистическа значимост само при най-високата концентрация.

4.2.11 Ефект на СМВ и СБАВ върху експресията на SIRT1

SIRT1 е регулатор на редица клетъчни процеси, свързани с метаболизма, редокс хомеостазата и отговора към клетъчен стрес. Резултатите от изследването на ефектите на природните източници на сяра върху експресията на SIRT1 са представени на фигури 23 и 24. Самостоятелното третиране на клетките с ЛПЗ доведе до статистически значимо понижение на експресията на SIRT1 до 0,70 RU (p=0,03) спрямо нетретираните клетки. За разлика от това, прилагането на СК доведе до статистически значимо повишение на експресията, приблизително двукратно спрямо нетретираните клетки (p=0,015).

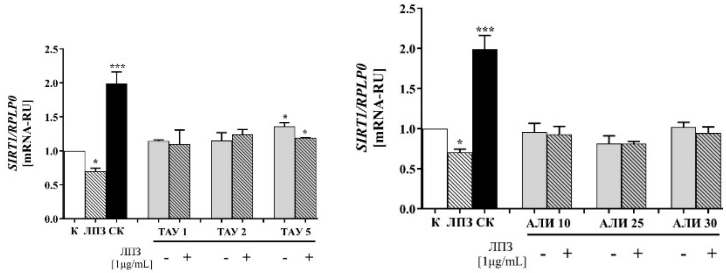
При СМВ не беше установена статистически значима промяна в експресията на SIRT1 при нито една от приложените концентрации и при нито едно от експерименталните условия (фиг. 23).



Фигура 23 *Ефект на СМВ (ляво) и СФН (дясно) върху експресията на SIRT1 в HIEC-6, (*p ≤ 0,05; ***p ≤ 0,001 спрямо К).*

Сред изследваните природни източници на сяра най-широко изразен профил на промяна в експресията на SIRT1 беше установен при СФН (фиг. 23 дясно). В нестимулирани клетки всички приложени концентрации доведоха до статистически значимо повишение на експресията. При 0,5 μg/mL нивото на

експресия достигна 1,14 RU (p=0,05), при 1 μg/mL – 1,10 RU (p=0,05), а при 2 μg/mL – 1,24 RU (p=0,05). В ЛПЗ-стимулирани клетки не беше установена статистически значима промяна в експресията на SIRT1 при нито една от изследваните концентрации.



Фигура 24. *Ефект на ТАУ (ляво) и АЛИ (дясно) върху експресията на SIRT1 в HIEC-6 (*p ≤ 0,05; ***p ≤ 0,001 спрямо К).*

При ТАУ статистически значимо повишение на експресията на SIRT1 беше установено само при концентрация 5 mM, както в нестимулирани, така и в ЛПЗ-стимулирани клетки (фиг. 24). В нестимулирани клетки нивото на експресия достигна 1,42 RU (p=0,04), а при ЛПЗ-стимулирани клетки – 1,12 RU (p=0,03). При по-ниските концентрации на ТАУ не беше установена статистически значима промяна в експресията на SIRT1.

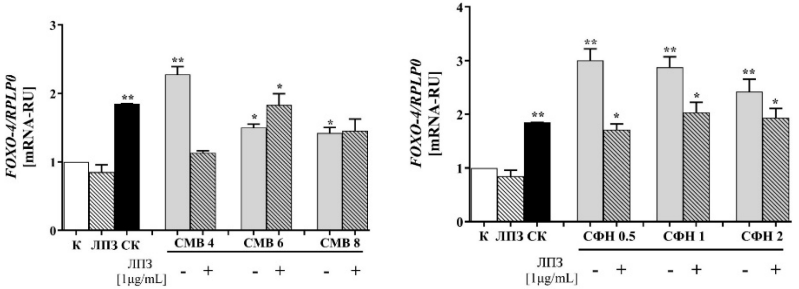
При АЛИ не беше установена статистически значима промяна в експресията на SIRT1 при нито една от приложените концентрации, както в нестимулирани, така и в ЛПЗ-стимулирани клетки (фиг. 24 дясно).

В обобщение, сред изследваните природни източници на сяра СФН показва най-широко изразен ефект върху експресията на SIRT1, като статистически значимо повишение се установява при всички изследвани концентрации в нестимулирани клетки. При ТАУ промяна се наблюдава само при най-високата концентрация и в двете експериментални условия, докато при СМВ и АЛИ не се установяват статистически значими промени. В условията на ЛПЗ-индуцирано възпаление нито един от четирите изследвани

източника на сяра не води до статистически значимо повишение на експресията на SIRT1 при всички приложени концентрации.

4.2.12 Ефект на СМВ и СБАВ върху експресията на FOXO 4

Графиките 25 и 26 представят ефектите на изследваните природни източници на сяра върху експресията на FOXO4 – транскрипционен фактор, свързан с регулацията на клетъчния стресов отговор и процеси, поддържащи клетъчната хомеостаза. Самостоятелното приложение на ЛПЗ не доведе до статистически значима промяна в експресията на FOXO4, докато СК, използвана като референтна контрола, повиши експресията почти двукратно до 1,84 RU ($p<0,001$).

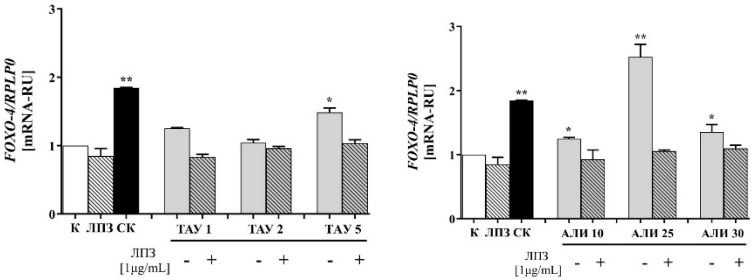


Фигура 25. *Ефект на СМВ (ляво) и СФН (дясно) върху експресията на FOXO4в HIEC-6 (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01 спрямо К).*

Както е показано на фигура 25, СМВ повиши статистически значимо експресията на FOXO4 в нестимулирани клетки при всички приложени концентрации. Нивата на експресия при 4%, 6% и 8% СМВ бяха съответно 2,27 RU ($p=0,006$), 1,50 RU ($p=0,04$) и 1,42 RU ($p=0,05$). В условията на ЛПЗ-индуцирано възпаление статистически значимо повишение беше установено при 6% СМВ, при което експресията достигна 1,80 RU ($p=0,011$). При 8% СМВ се наблюдаваше тенденция към повишение на експресията до 1,45 RU, но разликата не достигна статистическа значимост ($p=0,07$).

Сред изследваните третирания най-изразено повишение на експресията на FOXO4 беше установено при СФН. В нестимулирани клетки СФН повиши експресията между 2,5- и 3-

кратно, а в условията на ЛПЗ-индуцирано възпаление също беше установено статистически значимо повишение, макар и с по-малка изразеност (фиг. 25).



***Фигура 26**. Ефект на ТАУ (ляво) и АЛИ (дясно) върху експресията на FOXO4в HIEC-6, (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01 спрямо К).*

При ТАУ статистически значимо повишение на експресията на FOXO4 беше установено само при най-високата приложена концентрация от 5 mM в нестимулирани клетки, при което нивото на експресия достигна 1,48 RU (p=0,02). В условията на ЛПЗ-индуцирано възпаление не беше установен статистически значим ефект на ТАУ. По-ниските концентрации от 1 и 2 mM също не доведоха до статистически значими промени в експресията при нито едно от двете експериментални условия (фиг. 26).

При АЛИ статистически значимо повишение на експресията на FOXO4 беше установено при всички приложени концентрации, но само в нестимулирани клетки (фиг. 26). Нивата на експресия при 10, 25 и 30 μg/mL бяха съответно 1,25 RU (p=0,05), 2,50 RU (p=0,01) и 1,35 RU (p=0,04). В условията на ЛПЗ-индуцирано възпаление нито една от приложените концентрации на АЛИ не доведе до статистически значима промяна в експресията на FOXO4.

В обобщение, повишение на експресията на FOXO4 в нестимулирани клетки беше установено и при четирите изследвани природни източника на сяра, но с различна степен и концентрационен профил. СФН показа най-широко изразен

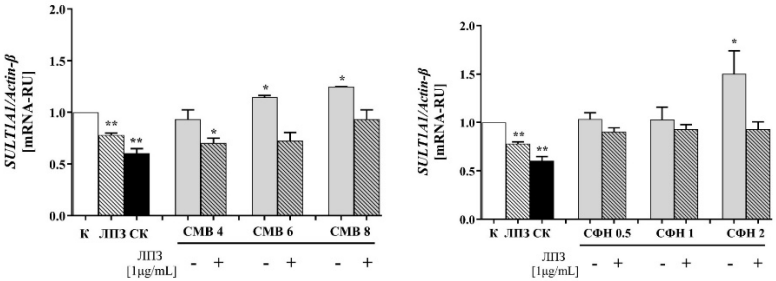
ефект, включително при ЛПЗ-стимулирани клетки, докато при СМВ и АЛИ повишението беше преимуществено ограничено до нестимулирани клетки. При ТАУ промяна беше установена само при най-високата концентрация в нестимулирани клетки.

4.2.13 Ефект на СМВ и СБАВ върху експресията на SULT1A1

SULT1A1 кодира ензим от фаза II на биотрансформацията, който участва в сулфатирането на множество ендогенни и екзогенни съединения, включително стероидни и тиреоидни хормони и лекарствени вещества.

Резултатите за ефектите на изследваните природни източници на сяра върху експресията на SULT1A1 са представени на фигури 27 и 28. Самостоятелното приложение на ЛПЗ доведе до статистически значимо понижение на експресията на SULT1A1 до 0,78 RU (p=0,002), докато СК, използвана като референтен контрол, понижи експресията до 0,60 RU (p=0,01).

При СМВ беше установен различен профил на ефект в зависимост от експерименталното условие и концентрацията (фиг. 27 ляво). В нестимулирани клетки 6% и 8% СМВ доведоха до статистически значимо повишение на експресията на SULT1A1 до съответно 1,15 RU (p=0,02) и 1,20 RU (p=0,03). В условията на ЛПЗ-индуцирано възпаление при най-ниската концентрация от 4% СМВ беше установено статистически значимо понижение на експресията до 0,70 RU (p=0,02). При останалите концентрации на СМВ не са посочени статистически значими промени.

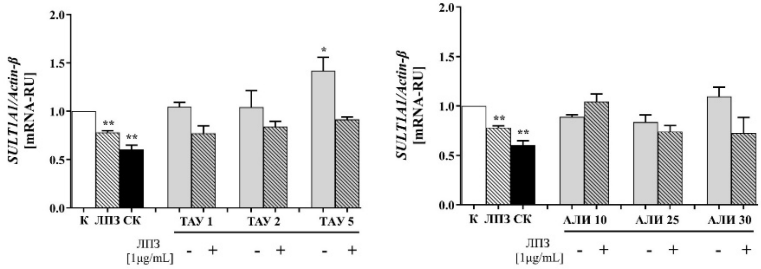


Фигура 27. *Ефект на СМВ (ляво) и СФН (дясно) върху експресията на SULT1A1 в HIEC-6,(*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01 спрямо К).*

СФН показа по-ограничен ефект върху експресията на SULT1A1 (фиг. 27 дясно). Статистически значимо повишение беше установено само при най-високата концентрация от 2 μg/mL в нестимулирани клетки, при която експресията достигна 1,50 RU (p=0,05). При концентрации 0,5 и 1 μg/mL не бяха установени статистически значими промени в експресията при нито едно от двете експериментални условия.

Подобен ограничен профил беше установен и при ТАУ (фиг. 28 ляво). Най-високата концентрация от 5 mM доведе до статистически значимо повишение на експресията на SULT1A1 до 1,42 RU (p=0,02) в нестимулирани клетки. При по-ниските концентрации и в условията на ЛПЗ-индуцирано възпаление не бяха установени статистически значими промени.

АЛИ не доведе до статистически значими промени в експресията на SULT1A1 при нито една от приложените концентрации и при нито едно от двете експериментални условия (фиг. 28 дясно).



***Фигура 28**. Ефект на ТАУ върху експресията на SULT1A1 в HIEC-6,(*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01 спрямо К)*

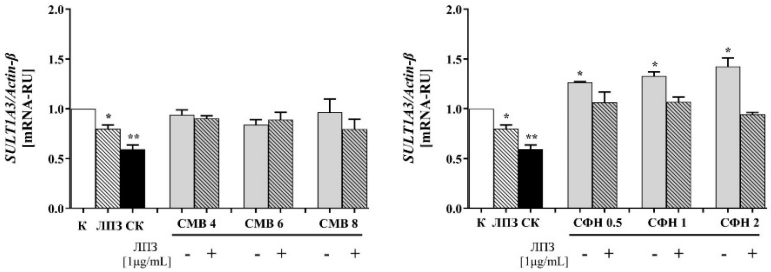
В обобщение, СМВ показа най-широк и зависим от експерименталното условие профил на промяна в експресията на SULT1A1, включващ повишение в нестимулирани клетки и понижение при ЛПЗ-стимулирани клетки при определени концентрации. При СФН и ТАУ повишение на експресията беше установено само при най-високата приложена концентрация и единствено в нестимулирани клетки, докато АЛИ не предизвика статистически значими промени.

4.2.14 Ефект на СМВ и СБАВ върху експресията на SULT1A3

SULT1A3 кодира ензим от фаза II на биотрансформацията, известен като катехоламин-сулфотрансфераза, който участва в сулфатирането на катехоламини и други субстрати.

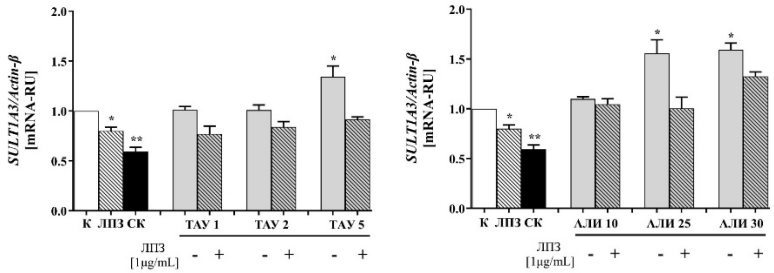
Резултатите за ефектите на изследваните природни източници на сяра върху експресията на SULT1A3 са представени на фигури 29 и 30. Самостоятелното приложение на СК и ЛПЗ доведе до статистически значимо понижение на експресията на гена до съответно 0,59 RU (p=0,007) и 0,80 RU (p=0,05).

При СМВ не беше установена статистически значима промяна в експресията на SULT1A3 при нито една от приложените концентрации и при нито едно от двете експериментални условия (фиг. 29 ляво).



Фигура. 29. *Ефект на СМВ (ляво) и СФН (дясно) върху експресията на SULT1A3 в HIEC-6, (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01 спрямо К).*

Сред изследваните природни източници на сяра най-широк профил на повишение на експресията на SULT1A3 беше установен при СФН (фиг. 29 дясно). И трите приложени концентрации доведоха до статистически значимо повишение на експресията в нестимулирани клетки, като нивата при 0,5, 1 и 2 μg/mL бяха съответно 1,26 RU (p=0,04), 1,33 RU (p=0,02) и 1,42 RU (p=0,011). В условията на ЛПЗ-индуцирано възпаление не бяха установени статистически значими промени при нито една от концентрациите.



Фигура 30. *Ефект на ТАУ (ляво) и АЛИ (дясно) върху експресията на SULT1A3 в HIEC-6,(*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01 спрямо К).*

При ТАУ също беше установено повишение на експресията на SULT1A3, но само при най-високата приложена концентрация от 5 mM в нестимулирани клетки, при което експресията достигна 1,34 RU (p=0,05). При по-ниските концентрации и в условията на ЛПЗ-индуцирано възпаление не бяха установени статистически значими промени (фиг. 30 ляво).

При АЛИ статистически значимо повишение на експресията на SULT1A3 беше установено в нестимулирани клетки при двете по-високи концентрации – 25 и 30 μg/mL, при които нивата на експресия достигнаха съответно 1,55 RU (p=0,04) и 1,59 RU (p=0,05). При останалите условия не беше установена статистически значима промяна (фиг. 30 дясно).

В обобщение, изследваните природни източници на сяра показаха различни профили на промяна в експресията на SULT1A3. СФН предизвика повишение при всички приложени концентрации в нестимулирани клетки, докато при ТАУ и АЛИ ефектът беше ограничен съответно до най-високата и до двете по-високи концентрации. При СМВ не беше установена статистически значима промяна. Характерна особеност на СФН, ТАУ и АЛИ беше, че повишението на експресията се наблюдаваше само в нестимулирани клетки, без статистически значими промени при ЛПЗ-индуцирано възпаление.).

4.3 *КОРЕЛАЦИОННИ АНАЛИЗИ*

Беше направен корелационен анализ на експресията на всичките 14 гена за четирите източници на сяра, както при

нестимулирани HIEC-6 клетки, така и при ЛПЗ-индуцирано възпаление. Беше приложена линейна корелация на Pearson (r), а данните са представени като корелационни матрици с цветно кодиране.

4.3.1 Сравнение на корелационните зависимости под действието на СМВ, в нестимулирани клетки и в условия на индуцирано възпаление

При клетките, третирани със СМВ, ЛПЗ-индуцираното възпаление се асоциира със селективно преструктуриране на експресионните зависимости. Наблюдава се по-тясна координация между основните провъзпалителни гени, особено NF-κB, TNF-α, IL-6, IL-8, COX-2 и Caspase-1, но не и еднопосочно усилване на всички взаимовръзки, което показва специфична реорганизация на възпалителния експресионен модул. Паралелно с това се засилват отрицателните зависимости между NF-κB и гените, свързани с антиоксидантно-адаптивния отговор, докато Nrf2, GPx, SIRT1 и FOXO4 формират по-координиран експресионен профил. Тези резултати показват различно структуриране на възпалителния и адаптивния експресионен отговор при ЛПЗ-стимулация.

Особен интерес представляват IL1RN и SULT1A1, чиито характерни зависимости с двата основни експресионни модула при нестимулирани условия се отслабват или променят при ЛПЗ. Така корелационният анализ очертава асоциирана с ЛПЗ реорганизация на експресионните взаимоотношения при третиране със СМВ, характеризираща се с по-ясно разграничаване на провъзпалителния и антиоксидантно-адаптивния профили. Тези зависимости имат експлораторен характер и не доказват причинно-следствени или механистични взаимоотношения.

4.3.2 Сравнение на корелационните зависимости под действието на СФН, в нестимулирани клетки и в условия на индуцирано възпаление

Основният ефект на ЛПЗ върху експресионните зависимости при третиране със СФН се изразява в преход от сравнителна хетерогенност в корелационните зависимости към по-ясно организирани и противопоставени функционални модули. При индуцирано възпаление провъзпалителните

маркери формират по-координиран профил, докато антиоксидантно-адаптивните гени се групират в отделен, вътрешно съгласуван модул. Особено показателна е оста Nrf2/GPx, която запазва изключително силна положителна зависимост независимо от възпалителния контекст (r = 0.97 без ЛПЗ и r = 0.98 с ЛПЗ). Това определя координацията между Nrf2 и GPx като една от най-устойчивите характеристики на експресионния отговор към СФН и е съвместимо със запазването на тясната връзка между Nrf2-свързания транскрипционен отговор и антиоксидантната защита при наличие на възпалителен стимул.

Същевременно ефектът на ЛПЗ не се ограничава до запазването на тази ос, а включва по-широко преструктуриране на отношенията между възпалителния и защитния профил. При интерпретацията следва да се подчертаят конкретните промени в корелациите на NF-κB, TNF-α, IL-6, IL-8, COX-2, Caspase-1 и IL-1β спрямо Nrf2, GPx, SIRT1 и FOXO4, тъй като именно едновременното усилване на вътрешните зависимости в провъзпалителния модул и отрицателните му зависимости с антиоксидантно-адаптивните гени би обосновало заключението за по-ясно функционално разграничаване на двата профила. В този контекст стабилността на Nrf2/GPx при преминаване от базално към ЛПЗ-стимулирано състояние показва, че възпалителният стимул реорганизира по-силно отношенията на антиоксидантния модул с останалата експресионна мрежа, отколкото вътрешната координация между Nrf2 и GPx.

Корелационната матрица при сулфорафан без стимулиране с ЛПЗ показва ясно изразена корелация между експресията на гените за антиоксидантна защита и стресова адаптация. Както може да се види на фигура 63 транскрипционният фактор Nrf2 е в силна положителна връзка с GPx (r = 0,97), а така също и експресията на SIRT1 (r = 0,81), FOXO4 (r = 0,79), SULT1A1 (r = 0,77) и особено със SULT1A3 (r = 0,98). Освен това, експресията на GPx е силно положително свързана с тази на FOXO4 (r = 0,91) и практически идентично със SULT1A3 (r = 1,00). В този модул може да се включи и IL1RN чрез положителни корелации с Nrf2 (r = 0,89), GPx (r = 0,93), SIRT1 (r = 0,83), FOXO4 (r = 0,91) и SULT1A3 (r = 0,91).

4.3.3 *Сравнение на корелационните зависимости под действието на ТАУ, в нестимулирани клетки и в условия на индуцирано възпаление*

При директно сравнение на двете корелационни матрици под действието на ТАУ, най-голямо впечатление прави коренната промяна в експресионния профил на IL1RN спрямо провъзпалителните и антиоксидантните гени. В нестимулирани клетки, IL1RN е ясно противопоставен на основните провъзпалителни маркери: отчетени са значителни отрицателни корелации с NF-κB, TNF-α и с IL-6. Същевременно той е положително свързан с антиоксидантните и стрес-адаптивните гени – Nrf2, GPx, SIRT1 и FOXO4. В условията на ЛПЗ-индуцирано възпаление тази конфигурация се обръща в значителна степен. IL1RN започва да корелира положително с NF-κB ($r = 0.93$), TNF-α ($r = 0.75$), IL-6 ($r = 0.98$) и Caspase-1 ($r = 0.98$), като и връзката с IL-1β се усилва от практически липсваща при базални условия ($r = -0,09$) до силно положителна ($r = 0,74$). Успоредно с това зависимостите на IL1RN с Nrf2, GPx, SIRT1 и FOXO4 променят посоката си и стават отрицателни.

Може да се обобщи, че под действие на ТАУ без източник на възпаление експресията на IL1RN е в корелационна зависимост близка до антиоксидантния и стрес-адаптивния профил и е противоположна на ключови провъзпалителни гени. При ЛПЗ-стимулация експресията на този маркер се препозиционира към профил, който се изменя паралелно с голяма част от възпалителните маркери и противоположно на Nrf2/GPx/SIRT1/FOXO4. Това вероятно може да се обясни с естествената роля на IL1RN като антагонист на рецептора на IL-1 в условия на активиран възпалителен отговор.

4.3.4 *Сравнение на корелационните зависимости под действието на АЛИ, в нестимулирани клетки и в условия на индуцирано възпаление*

При третиране с АЛИ, ЛПЗ-индуцираното възпаление се асоциира с отчетлива реорганизация на корелационната картина – от сравнително хетерогенен профил в нестимулираните клетки към по-ясно поляризирана структура, характеризираща се с по-

силно разграничаване между провъзпалителните и антиоксидантно-адаптивните експресионни зависимости. При индуциране на възпаление се засилва координацията между ключови маркери на провъзпалителния панел, включително NF-κB, TNF-α, Caspase-1 и IL-1β, докато техните зависимости с Nrf2/GPx-свързания профил стават силно отрицателни. Особено показателна е промяната на експресионната зависимост NF-κB/Nrf2, чиято отрицателна корелация се усилва от r = -0.70 в нестимулирани клетки до r = -0.92 при прилагане на ЛПЗ. Подобна е противопоставяне се наблюдава и между NF-κB и GPx (от r = -0.82 към r = -0.93), както и между NF-κB и FOXO4 (r = -0.41 към -0.95), което показва, че при възпалителен стимул експресионните вариации на тези защитни маркери стават много по-подчертано противоположни на експресията на NF-κB.

Паралелно с това се засилва вътрешната координация на антиоксидантно-адаптивния профил. Връзката Nrf2/GPx остава силно положителна (r = 0.86 в нестимулирани клетки и r = 0.90 в присъствие на ЛПЗ), докато корелацията Nrf2/FOXO4 се усилва съществено (от r = 0.42 до r = 0.81). Особено отчетливо е включването на SULT1A3 в този корелационен профил: експресионната зависимост Nrf2/SULT1A3 нараства от r = 0.74 до r = 0.96, а GPx/SULT1A3 остава изключително силна и допълнително се увеличава в условията на възпаление от r = 0.96 до r = 0.98. Същевременно, SULT1A3 придобива по-силни отрицателни зависимости с част от провъзпалителните маркери, включително Caspase-1 (от r = -0.48 в нестимулирани клетки до r = -0.97 при индуцирано възпаление) и IL-1β (съответно r = -0.32 и r = -0.87). Следователно, при третиране с индуцираното възпаление не просто усилва отделни корелации, а се асоциира с по-изразена поляризация в на експресиите на двата основни профила - провъзпалителен и антиоксидантен

4.3.5 Интегриран сравнителен анализ на експресионните зависимости под действието на изследваните хранителни източници на сяра

Сравнителният анализ на осемте корелационни матрици очерта два функционално различими експресионни модула: възпалителен, включващ основно NF-κB, TNF-α, IL-6, IL-8, COX-

2, Caspase-1 и IL-1β, и редокс/адаптивен, концентриран около Nrf2 и GPx, към който в зависимост от третиранията се присъединяват SIRT1, FOXO4, IL1RN и SULT1A1/SULT1A3. ЛПЗ-индуцираното възпаление като цяло засилва еднопосочността на зависимостите между маркерите от възпалителния модул, но специфичният експресионен профил се различава между изследваните агенти. При СФН се откроява устойчив Nrf2/GPx модул, при СМВ – ясно противопоставяне между NF-κB и Nrf2, а при АЛИ – изразена поляризация между възпалителния и редокс/адаптивния панел. ТАУ показва динамични зависимости на IL1RN спрямо останалите маркери.

Най-устойчивата положителна зависимост е между Nrf2 и GPx, запазена при всички осем условия, макар и с различна сила. Обратно, NF-κB и Nrf2 показват последователна отрицателна зависимост във всички матрици. Тези резултати подкрепят наличието на координирани експресионни профили, чието проявление зависи от природата на агента и клетъчното състояние. Корелационният анализ е експлораторен и не доказва причинно-следствени или механистични връзки.

Таблица 2. *Сравнителен анализ на най-значимите експресионни зависимости*

Третиране	**- ЛПЗ**	**+ЛПЗ**
Nrf2/GPx		
СМВ	0.99 (*p=0,01*)	0.90 (*p=0,04*)
СФН	0.98 (*p=0,03*)	0.97 (*p=0,004*)
ТАУ	0.89 (*ns)*	0.54 (*p=0.04*)
АЛИ	0.90 (*ns)*	0.86 (*p=0.04*)
NF-κB/Nrf2		
СМВ	−0.79 (*ns)*	−0.99 *(p<0.001*)
СФН	−0.96 (*p=0.04*)	−0.71 (*ns)*
ТАУ	−0.58 (*ns)*	−0.57 (*ns)*
АЛИ	−0.70 (*ns)*	−0.92 *(p=0.03*)

5 ДИСКУСИЯ

В настоящото проучване СМВ и СБАВ бяха сравнени по отношение на техния потенциал да модулират про- и противовъзпалителни маркери в *in vitro* модел на индуцирано от ЛПЗ възпаление в човешки чревни епителни клетки. Доколкото е известно, това е първото проучване, изследващо противовъзпалителния потенциал на СМВ от Варненския басейн в сравнение с добре проучени съединения, съдържащи сяра.

Ефекти на СМВ и СБАВ върху клетъчната жизненост

Оценката на клетъчната жизненост позволи да се определи диапазонът от концентрации, подходящи за последващо изследване. Всички приложени концентрации на СМВ и ТАУ запазват жизнеността на HIEC-6 над 80%, което подкрепя отсъствието на изразена цитотоксичност при изследваните условия. При АЛИ също не се установява намаляване на жизнеността под този праг, въпреки статистически значимите промени при по-високите концентрации. Тези резултати са съвместими с публикуваните данни за различията в цитотоксичния потенциал на чесновите органосулфиди спрямо нормални и туморни клетки (Mansingh et al. 2018; Zhang et al. 2020).

СФН показва по-диференциран профил, с повишаване на измерената жизненост при междинните концентрации и намаляване при най-високата. Наблюдаваният отговор е съвместим с описаната зависимост на ефектите на СФН от концентрацията, клетъчния тип и експерименталния модел (Baralić et al. 2024). Като цяло резултатите показват, че използваният концентрационен диапазон на СМВ, ТАУ и АЛИ е съвместим с поддържане на клетъчната жизненост, докато при СФН ефектът е по-силно концентрационно зависим. Получените данни осигуряват експериментална основа за интерпретацията на последващите промени в генната експресия.

Ефекти на СМВ и СБАВ върху експресията на гена NF-kB

ЛПЗ-индуцираното повишение на експресията на NF-κB потвърждава формирането на провъзпалителен транскрипционен отговор в използвания HIEC-6 модел, докато понижението след салицилова киселина показва чувствителността му към противовъзпалително повлияване. При интерпретацията на

резултатите следва да се отчита, че изследването проследява експресията на NF-κB-свързания транскрипт, а не функционалната активност на целия NF-κB сигнален път.

СМВ показва най-последователен профил, като 6% и 8% понижават експресията на NF-κB както в нестимулирани, така и в ЛПЗ-стимулирани клетки, с тенденция към по-силен ефект при по-висока концентрация. Тези резултати са съвместими с публикуваните данни за способността на H_2S и сулфидните съединения да модулират NF-κB-свързани възпалителни процеси (Sen et al. 2012; Rios et al. 2015; Bhatia and Gaddam 2021; Shahid and Bhatia 2024; Xu et al. 2026). Същевременно различният профил, описан за комплексна сярна термална вода, подчертава, че ефектите на минералната вода не могат да бъдат приписани единствено на H_2S (Prandelli et al. 2013). Комплексният минерален състав на СМВ също следва да се има предвид, поради което относителният принос на отделните компоненти не може да бъде определен в настоящия модел.

Третирането със СФН потиска експресията на NF-κB при всички изследвани концентрации в нестимулирани клетки, докато при ЛПЗ-стимулация значим ефект се установява само при 2 μg/mL. Този профил е съвместим с данни за противовъзпалително и редокс-модулиращо действие на СФН в интестинални и други клетъчни модели, но същевременно подчертава зависимостта на ефекта от концентрацията и експерименталните условия (Heiss et al. 2001; Heiss and Gerhäuser 2005; Zhang and Wu 2021). При ТАУ ефектът също зависи от концентрацията и наличието на ЛПЗ, което съответства на съобщеното повлияване на TLR/NF-κB-свързани процеси в епителни модели (Lin et al. 2025; Xiao et al. 2025). Тези резултати следва да се разграничават от ефектите, приписвани на TauCl, тъй като настоящото изследване е проведено с ТАУ.

Най-ограничено повлияване на NF-κB показва АЛИ, като значимо понижение се установява при 30 μg/mL и при двете експериментални условия. Данните са в съответствие с публикувани сведения за противовъзпалителна активност на АЛИ, но същевременно с резултати, показващи различна чувствителност в зависимост от клетъчния модел (Shi et al. 2017; Wang et al. 2017; Quintero-Fabián et al. 2013; Ho and Su 2014).

Поради това ефектите на АЛИ в HIEC-6 не следва да се екстраполират пряко към по-реактивни органосулфиди от чесъна.

Сравнителният анализ показва, че четирите природни сяросъдържащите агента модулират експресията на NF-κB с различна концентрационна и контекстуална зависимост. СМВ се характеризира с най-последователен ефект, СФН – с широк ефект в нестимулирани клетки, ТАУ – с изразена зависимост от концентрацията и възпалителния стимул, а АЛИ – с ефект, проявяващ се преимуществено при най-високата изследвана концентрация. В рамките на извършеното литературно търсене не са установени директно съпоставими изследвания в HIEC-6 клетки при аналогичен експериментален дизайн, което определя резултатите като допълващи наличните данни за експресионното повлияване на NF-κB от различни природни сяросъдържащите източници.

Ефекти на СМВ и СБАВ върху експресията на гена TNF-α

TNF-α е ключов медиатор на възпалителния отговор, поради което промените в неговата експресия представляват важен показател за възпалителния профил на изследвания клетъчен модел. В настоящото проучване СМВ и всички изследвани сяросъдържащите агенти показват потенциал да потискат експресията на TNF-α, като ефектите на СМВ, СФН и ТАУ са зависими от концентрацията и се проявяват по-ясно при ЛПЗ-индуцирани условия. При 8% СМВ и 5 mM ТАУ потискането се наблюдава както в нестимулирани, така и в ЛПЗ-стимулирани клетки, докато АЛИ показва значим ефект при специфични концентрации и условия.

Резултатите за СФН, ТАУ и АЛИ са в съответствие с публикувани експериментални данни за способността им да ограничават експресията на провъзпалителни медиатори. При СФН са описани противовъзпалителни ефекти в интестинални клетъчни модели, включително при ЛПЗ-индуцирани условия (Zhang and Wu 2021), докато за ТАУ са съобщени ефекти върху възпалителните цитокини в различни експериментални модели (Ma et al. 2022). Данните за АЛИ също подкрепят неговия потенциал за повлияване на експресията на провъзпалителни гени (Ruhee et al. 2019; Lv et al. 2021). Тези литературни данни са

съвместими с установените в настоящото изследване промени, но не позволяват пряко извеждане на конкретен механизъм в HIEC6.

Особен интерес представлява профилът на CMB, при който се установява концентрационно обусловено потискане на експресията на TNF-α при различни експериментални условия. Като комплексен природен източник, CMB съдържа серни съединения и минерални компоненти, но настоящият експериментален дизайн не позволява да се определи относителният принос на отделните съставки. Получените резултати допълват наличните данни за биологичните ефекти на CMB и подкрепят необходимостта от последващо изследване на компонентите и механизмите, свързани с наблюдаваните промени в експресията на възпалителни гени.

Ефекти на CMB и СБАВ върху експресията на гена за IL-6

В настоящото изследване ТАУ и CMB показват най-изразено потискане на експресията на IL-6, особено при ЛПЗ-индуцирани условия. При АЛИ значим ефект се установява само при 10 μg/mL, докато СФН не повлиява значимо експресията на IL-6 независимо от наличието на възпалителен стимул. Тези резултати показват, че отделните сяросъдържащите агенти имат различен профил на повлияване на този възпалителен маркер.

Ефектът на ТАУ е в съответствие с публикуваните данни за потискане на IL-6 в различни експериментални модели на възпаление (Schaffer et al. 2014; Ma et al. 2022). Установяването на сходен профил в HIEC-6 допълва наличните данни за действието му в чревни клетъчни модели. CMB също потиска експресията на IL-6 при ЛПЗ-стимулация. Това съответства на данни за противовъзпалително действие на сулфидни минерални води в други клетъчни модели, при които е описано понижение на IL-6 и други възпалителни медиатори (Cheleschi et al. 2020; Carbajo et al. 2025). Като комплексен природен източник обаче, CMB не позволява да се определи относителният принос на отделните серни и минерални компоненти.

Ограниченият ефект на АЛИ, проявен само при една концентрация, подчертава зависимостта на отговора от концентрацията и клетъчния модел. Наличните данни за други органосулфиди, включително алицин, показват сходна чувствителност към експерименталните условия, но не

позволяват пряко екстраполиране към АЛИ. Особено показателна е липсата на значим ефект на СФН върху IL-6, която се различава от съобщаваното в други клетъчни модели потискане на този цитокин (Zhang and Wu 2021; Lv et al. 2021). Тази разлика вероятно отразява специфичността на клетъчния модел и показва, че липсата на промяна в един възпалителен транскрипт не изключва повлияване на други компоненти на клетъчния отговор.

В обобщение, IL-6 се откроява като чувствителен транскрипционен маркер към ТАУ и СМВ в HIEC-6, докато АЛИ показва ограничен, а СФН – несъществен ефект при изследваните условия. Различията между агентите подчертават зависимостта на техните експресионни ефекти от химичната природа на съединението, концентрацията и клетъчния контекст и подкрепят необходимостта от паралелно проследяване на множество възпалителни и редокс-свързани гени.

Ефекти на СМВ и СБАВ върху експресията на гена за IL-8

В настоящото изследване ТАУ е единственият от изследваните сяросъдържащите агенти, който потиска експресията на IL-8, като ефектът е по-изразен при ЛПЗ-стимулация. За разлика от него, СФН, АЛИ и СМВ не предизвикват значими промени в експресията на IL-8 при изследваните условия. Ефектът на ТАУ съответства на публикувани in vitro данни за потискане на IL-8 при възпалителна стимулация и допълва наличните сведения за противовъзпалителните му ефекти в чревни клетъчни модели (Barua et al., 2001; Schaffer et al., 2014; Ma et al., 2022). Съчетан с установеното потискане на IL-6, този резултат отличава ТАУ от останалите изследвани агенти по широтата на влиянието му върху експресията на възпалителни цитокини.

Липсата на значим ефект на СФН върху IL-8, както и върху IL-6, се различава от данните в други клетъчни модели, което вероятно отразява зависимостта на експресионния отговор от клетъчния контекст и експерименталните условия (Zhang and Wu, 2021; Ruhee et al., 2019; Lv et al., 2021). Подобно отсъствие на промяна при АЛИ и СМВ показва, че ефектите на изследваните агенти не са еднакви за отделните възпалителни транскрипти. Ограничените данни за СМВ върху IL-8 и

различията между експресионни и белтъчни показатели в други модели допълнително предполагат необходимост от предпазлива интерпретация на този резултат (Cheleschi et al., 2020; Carbajo et al., 2025). Данните за АЛИ също показват зависимост на противовъзпалителните му ефекти от клетъчния модел и експерименталните условия (Quintero-Fabián et al., 2013; Shi et al., 2017).

В обобщение, IL-8 се характеризира с различна чувствителност към изследваните агенти, като ТАУ показва най-ясен ефект и едновременно потиска експресията на IL-6 и IL-8. Тези резултати подчертават значението на клетъчния контекст и на паралелното проследяване на множество възпалителни гени при оценка на експресионните ефекти на природни сяросъдържащите източници.

Ефекти на СМВ и СБАВ върху експресията на COX-2

В настоящото изследване СМВ, СФН и ТАУ показват различен, но преимуществено потискащ ефект върху експресията на COX-2, докато при АЛИ не се установяват значими промени. СМВ потиска експресията на COX-2 при най-високата изследвана концентрация както в нестимулирани, така и при ЛПЗ-стимулирани клетки, а ТАУ проявява концентрационно зависим ефект само при ЛПЗ-стимулация. Тези резултати са в съответствие с публикуваните данни за потискане на COX-2 от СФН при ЛПЗ-индуцирано възпаление (Shan et al. 2010; Lee et al. 2012; Ruhee et al. 2020) и допълват сведенията за влиянието на ТАУ върху експресията на възпалителни гени (Miao et al. 2011; Swiderski et al. 2023).

Ефектът на СМВ е особено значим предвид ограничения брой данни за действието на естествени сяросъдържащите минерални води върху експресията на COX-2 в интестинални клетъчни модели. Като комплексен природен източник обаче, СМВ не позволява да се определи приносът на отделните серни или минерални компоненти. Липсата на ефект на АЛИ показва, че неговото влияние върху възпалителната генна експресия не се проявява еднакво при всички маркери и не следва непременно профила на по-реактивни органосулфиди като алицина.

В обобщение, COX-2 се характеризира с различна чувствителност към изследваните агенти, като СМВ, СФН и ТАУ

показват потенциал за потискане на експресията му при специфични концентрационни и стимулиращи условия, докато при АЛИ такъв ефект не е установен. Различията подчертават значението на химичната природа на агента, концентрацията и клетъчния контекст при определяне на неговия експресионен профил.

Ефекти на СМВ и СБАВ върху генната експресия на гена за Caspase 1

В настоящото изследване и четирите природни източника на сяра потискат експресията на CASP1 в HIEC-6, с по-ясно проявление при ЛПЗ-стимулация, но с различен концентрационен и контекст-зависим профил. СМВ показва най-последователен ефект, като потиска експресията при всички изследвани концентрации както в нестимулирани, така и в ЛПЗ-стимулирани клетки. СФН проявява ефект при по-високите концентрации, ТАУ – преимуществено при ЛПЗ, а АЛИ – при 25 и 30 μg/mL. Съчетаното потискане на CASP1 и NF-κB при СМВ и СФН очертава сходен транскрипционен профил, без да доказва причинно-следствена връзка.

Резултатите са в съответствие с публикувани данни за влиянието на H_2S, СФН и ТАУ върху инфламазомно-свързани възпалителни процеси (Qin et al. 2019; Greaney et al. 2016; Nam et al. 2017). За АЛИ директните данни за CASP1 са ограничени, тъй като повечето изследвания са насочени към алицин, но неговата способност да модулира ЛПЗ-индуцирана възпалителна сигнализация подкрепя установения тук ефект (Shi et al. 2017; Quintero-Fabián et al. 2013). За СМВ директно съпоставими данни в HIEC-6 не са установени, което придава допълнителна стойност на получения експресионен профил.

Важно е, че настоящите данни отразяват транскрипционна модулация на CASP1 и не позволяват заключения за активността на каспаза-1 или за функционалното активиране на NLRP3-инфламазомата. В този контекст резултатите разширяват характеристиката на възпалителния експресионен отговор към ген, свързан с инфламазомната регулация.

Ефекти на СМВ и СБАВ върху експресията на гена за IL-1β

В настоящото изследване ТАУ и АЛИ потискат експресията на IL-1β единствено при ЛПЗ-индуцирани условия,

което показва зависимост на ефекта от възпалителния контекст и допълва публикуваните данни за противовъзпалителните свойства на двата агента. За разлика от тях, СМВ и СФН не предизвикват значими промени в експресията на IL-1β при изследваните условия. Различията между изследваните агенти подчертават специфичността на експресионния отговор в зависимост от клетъчния модел и условията на стимулация.

В HIEC-6 експресионният отговор на IL-1β може да се различава от описания в клетки с добре изразена NLRP3-инфламазомна система. Данни от ЛПЗ-стимулирани HIEC-6 показват възможност за NLRP3-независимо активиране на IL-1β чрез каспаза-4 (Chan et al. 2023), което предлага възможно обяснение за контекст-зависимия отговор към ТАУ и АЛИ. Тази интерпретация остава хипотетична, тъй като каспаза-4 и свързаните механизми не са изследвани в настоящото проучване. Получените резултати разширяват характеристиката на експресионния профил на IL-1β при третиране с природни сяросъдържащите източници в HIEC-6.

Ефекти на СМВ и СБАВ върху генната експресия на гена за IL1RN

IL1RN е естествен антагонист на рецептора за IL-1β и важен регулатор на възпалителния отговор, като балансът между IL-1β и IL1RN допринася за неговото ограничаване (Cardoso et al. 2022; Maculewicz et al. 2022). В настоящото изследване СМВ, СФН и АЛИ стимулират експресията на IL1RN в нестимулирани HIEC-6 клетки, докато при ЛПЗ-стимулация този ефект не се запазва. Това различие показва зависимост на IL1RN експресионния отговор от клетъчното състояние и условията на стимулация.

Установеният базален отговор на СМВ, СФН и АЛИ допълва наблюдаваното потискане на редица провъзпалителни гени и показва, че изследваните агенти могат да модифицират експресията на регулаторни компоненти на възпалителния отговор. Ограничените данни за транскрипционната регулация на IL1RN в интестинални клетъчни модели при третиране с природни сяросъдържащите източници придават допълнителна стойност на получените резултати. Въпреки това установените промени в IL1RN и IL-1β не доказват функционално изменение

на съотношението между двата медиатора или причинно-следствена регулация. Резултатите разширяват експресионната характеристика на изследваните агенти с данни за ген, свързан с противовъзпалителната регулация.

Ефекти на СМВ и СБАВ върху експресията на гена за Nrf2

Експресията на NRF2 се различаваше съществено между изследваните сяросъдържащите агенти. СФН показа най-изразен ефект, повишавайки експресията на NRF2 при всички концентрации, с по-силен отговор при ЛПЗ-стимулация. Тези резултати съответстват на установената роля на СФН като естествен активатор на Keap1–NRF2 сигналния път и на данните за свързаното с него антиоксидантно и противовъзпалително действие (Cuadrado et al., 2019; Zhang and Wu, 2021; Suzuki et al., 2023; Chen et al., 2024; Sezgin-Bayindir et al., 2025; Zhang, 2025).

ТАУ също повиши експресията на NRF2, но по-изразено в нестимулирани клетки, което показва различна зависимост на отговора от клетъчното състояние и е в съответствие с данни за участие на PI3K/Akt- и MAPK-зависими механизми (Schaffer et al., 2014; Ma et al., 2022). При СМВ значимо повишение се наблюдава само при 8% и единствено без ЛПЗ. Ограничените литературни данни за СМВ и близки минерални води, както и проучванията с H_2S-донори, подкрепят възможното участие на серни съединения в регулацията на Keap1–NRF2 сигнализацията (Sen et al., 2012; Burguera et al., 2017; Cheleschi et al., 2020; Bhatia & Gaddam, 2021; Carbajo et al., 2025).

Ефекти на СМВ и СБАВ върху експресията на гена за GPx

Експресията на GPx показа различен профил в зависимост от изследвания сярасъдържащ агент и клетъчното състояние. СФН и ТАУ предизвикаха най-устойчиво повишаване на GPx както в нестимулирани, така и при ЛПЗ-стимулирани HIEC-6 клетки. При СФН този резултат съответства на данните за регулация на GPx2 от NRF2 и на установената му способност да активира антиоксидантния транскрипционен отговор (Banning et al., 2005; Dinkova-Kostova et al., 2002). Сходният отговор при ТАУ е в съответствие с данни за участието на NRF2-зависима антиоксидантна регулация в неговото действие, включително при възпалителна стимулация (Xu et al., 2023; Xiao et al., 2025).

При СМВ повишение на GPx се установи само при най-високата концентрация, докато АЛИ стимулира експресията при всички концентрации в нестимулирани клетки, но само при най-високата концентрация след ЛПЗ. Тези различия показват зависимост на транскрипционния отговор от химичната природа на агентите и клетъчното състояние. Макар литературните данни за АЛИ в този контекст да са ограничени, наблюдаваното действие е съвместимо с данни за влияние върху глутатион-зависимата антиоксидантна система (Sangeetha and Darlin Quine, 2009). Съпътстващите промени в NRF2 и GPx подкрепят наличието на координиран антиоксидантен транскрипционен отговор, без да доказват пряка причинно-следствена регулация.

Ефекти на СМВ и СБАВ върху експресията на гена за SIRT1

Експресията на SIRT1 показва различна чувствителност към изследваните сяросъдържащите агенти и към клетъчното състояние. СФН стимулира експресията при нестимулирани HIEC-6 клетки, което е в съответствие с данни за участието на SIRT1 в клетъчната адаптация към оксидативен и метаболитен стрес и с описаното влияние на СФН върху SIRT1-свързани сигнални пътища в интестинални клетки (Gezer, 2018; Zhang and Wu, 2021; Sezgin-Bayindir et al., 2025). Липсата на значим ефект при ЛПЗ-стимулация, за разлика от някои литературни данни, може да отразява различията между клетъчните модели и изследваните показатели, тъй като настоящото изследване оценява генната експресия, а не белтъчните нива или активността на SIRT1.

ТАУ повишава експресията на SIRT1 само при най-високата концентрация, като ефектът се запазва и при ЛПЗ, което показва различен профил спрямо СФН и е съвместимо с данни за влиянието на ТАУ върху клетъчната редокс-регулация (Schaffer et al., 2014; Ma et al., 2022). При СМВ и АЛИ не се установяват значими промени в SIRT1, въпреки ефектите им върху други изследвани гени. Това показва, че модулацията на SIRT1 не представлява универсален компонент на транскрипционния отговор към природните сяросъдържащите фактори и подчертава специфичността на реакцията към отделните агенти.

Ефекти на СМВ и СБАВ върху експресията на гена за FOXO4

Експресията на FOXO4 показва специфичен и зависим от клетъчното състояние отговор към изследваните сяросъдържащите агенти. СФН повишава експресията на FOXO4 при всички концентрации както в нестимулирани, така и при ЛПЗ-стимулирани HIEC-6 клетки. Този устойчив отговор е съвместим с публикуваните данни за влиянието на СФН върху FOXO-свързаните адаптивни и редокс-регулаторни процеси (Davis et al. 2009; Liu et al. 2020; Zhang et al., 2021; Sezgin Bayindir et al., 2025). Съпоставката със SIRT1 показва различен експресионен профил: докато SIRT1 се повишава само в нестимулирани клетки, FOXO4 се стимулира и при ЛПЗ, което показва, че промените в FOXO4 mRNA не са задължително свързани с повишаване на SIRT1 експресията. Това не изключва описаното посттранслационно взаимодействие между двата регулатора (van der Horst et al. 2004; Kobayashi et al. 2005).

ТАУ, СМВ и АЛИ показват по-условно действие. ТАУ и АЛИ стимулират FOXO4 преимуществено в нестимулирани клетки, докато при СМВ отговорът се запазва при ЛПЗ само при средната концентрация. Този профил подчертава зависимостта на транскрипционния отговор от химичната природа на агента, концентрацията и клетъчното състояние. При СМВ липсата на линейна концентрационна зависимост е съвместима с описаната за серните съединения концентрационно-зависима и потенциално хорметична регулация, но не позволява определяне на конкретен механизъм (Davinelli et al. 2019; Shahid and Bhatia 2024). Стимулирането на FOXO4 от АЛИ при всички изследвани концентрации в нестимулирани клетки, при липса на промени в SIRT1, допълва ограничените данни за биологичните му ефекти и представлява оригинално наблюдение в използвания клетъчен модел.

Ефекти на СМВ и СБАВ върху експресията на гените за ензимите SULT1A1 и SULT1A3

Експресията на SULT1A1 и SULT1A3 показва ясно различаващи се и зависими от клетъчното състояние отговори към изследваните сяросъдържащите агенти. СМВ повишава SULT1A1 иРНК при 6% и 8% в нестимулирани клетки, докато при ЛПЗ 4% СМВ я понижава; SULT1A3 не се променя значимо.

СФН повишава SULT1A1 само при най-високата концентрация, а SULT1A3 – при всички концентрации, но единствено в нестимулирани клетки. Тези резултати са съвместими с данни за модулиране на сулфотрансферазите от природни активни вещества и подчертават зависимостта на отговора от тъканта и клетъчното състояние (Lněničková et al. 2017; Suiko et al. 2017).

ТАУ повишава експресията и на двата гена само при най-високата концентрация и в нестимулирани клетки. АЛИ не променя SULT1A1, но повишава SULT1A3 иРНК при двете по-високи концентрации в нестимулирани HIEC-6. Ограничените литературни данни за директно действие на АЛИ върху SULT не позволяват механистично обяснение, но резултатът допълва знанията за неговата биологична активност и показва специфична регулация на SULT1A3. Съпоставимостта с данни за други чеснови органосулфиди, свързвани с модулация на ензими от фаза II, подкрепя необходимостта от допълнително изследване на този ефект (Song et al., 2021).

Съществено е, че ЛПЗ и салициловата киселина потискат експресията и на двата гена. Това подчертава влиянието на възпалителното състояние върху сулфотрансферазната експресия и вероятно допринася за липсата на стимулиращи отговори към част от изследваните агенти. Данните разширяват познанията за регулацията на SULT в интестинален клетъчен модел, като особено значим е наблюдаваният ефект на АЛИ върху SULT1A3.

6 ИЗВОДИ

1. В използвания експериментален модел сярната минерална вода, сулфорафанът, алиинът и тауринът запазват клетъчната жизненост в изследваните концентрационни диапазони, което позволява последващ анализ на техните биологични ефекти.

2. Изследваните природни източници на сяра се различават по своята способност да модулират възпалителния отговор в човешките интестинални епителни клетки.

3. Сярната минерална вода проявява широк спектър на въздействие върху експресията на основни гени за провъзпалителни маркери, което очертава нейния потенциал да влияе върху молекулните механизми, свързани с клетъчния възпалителен отговор.

4. Очаквано, сулфорафанът оказва най-съществено влияние върху експресията на гените, участващи в антиоксидантната защита и клетъчната адаптация, докато ефектите на таурина и алиина върху тези сигнални пътища са по-ограничени и зависят в по-голяма степен от приложената концентрация.

5. Сярната минерална вода, наред с влиянието си върху провъзпалителните медиатори, променя в положителна посока и експресията на гени, свързани с антиоксидантния отговор.

6. Изследваните източници на сяра проявяват различна селективност по отношение на експресията на сулфотрансферазите, като сярната минерална вода повлиява предимно експресията на SULT1A1, докато сулфорафанът и алиинът оказват по-изразено въздействие върху SULT1A3.

7. Най-устойчивата експресионн зависимост е Nrf2/GPx, като тя е положителна и се изменят в една и съща посока при всички изследвани третирания, както в нестимулирани клетки, така и в условията на ЛПЗ-индуцирано възпаление.

8. Отрицателната експресионна връзка NF-κB/Nrf2 се запазва във всички третирания, както в нестимулирани клетки, така и в условията на ЛПЗ-индуцирано възпаление..

7 ПРИНОСИ

ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР

1. Получени са нови експериментални данни за ефектите на сярасъдържащата минерална вода от Варненския басейн върху експресията на гени, свързани с възпалителния и редокс-свързания клетъчен отговор и биотрансформацията.

2. Разширени са познанията за молекулярните ефекти на слабо проучения органосулфид алиин, като е установен потенциалът му да модулира експресията на гени, свързани с възпалителния и редокс-свързания клетъчен отговор и биотрансформацията.

ПРИНОС С ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР:

1. Разработен и приложен е сравнителен клетъчен подход за предварителна оценка на молекулярните ефекти на природни източници на сяра в HIEC-6 клетки при базални и ЛПЗ-стимулирани условия.

ПРИНОС С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР

1. Получените резултати за сулфорафана и таурина допълват и подкрепят наличните литературни данни за влиянието им върху експресията на гени, свързани с възпалителния и редокс-свързания клетъчен отговор.

8 СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

8.1 Списък с публикации във връзка с дисертационния труд

Sokrateva T, Tasinov O, **Stoeva S,** Ivanova D, Nazifova-Tasinova N, Nashar M. Sulfur containing mineral water as a dietary factor challenging the Phase II detoxification enzymes in human intestinal cells. J of IMAB. 2022 Jul-Sep;28(3):4541-4547. DOI: 10.5272/jimab.2022283.4541

Stoeva, S., Sokrateva, T., Vankova, D., Pasheva, M., & Nashar, M. (2026). Anti-inflammatory potential of sulfurous mineral water and sulfur-containing bioactive compounds: a comparative study. Pharmacia, 73. https://doi.org/10.3897/pharmacia.73.e187811

8.2 Участия в научни форуми във връзка с дисертационния труд

Stefka Stoeva, Deyana Vankova, Milena Pasheva, Todorka Sokrateva, Milka Nashar. Anti-inflammatory effect of sulfur containing mineral water and sulforaphane in lipopolysaccharide-stimulated human intestinal epithelial cells: A comparative study. Годишна конференция по нутригеномика - NUGOWEEK 2023 "Impact of nutrition during different life stages – tracing the impact of diet on human health", 5-8 септември, 2023, Сенигалия, Италия (*Постер*)

Stefka Stoeva, Deyana Vankova, Milena Pasheva, Todorka Sokrateva, Milka Nashar. A comparative study of the biological effects of natural food sources of sulfur on human intestinal cells. Девети Фармацевтичен бизнес форум и Научно-практическа конференция Факултет „Фармация" – 15 години традиции, иновации, перспективи", 20 – 21 октомври 2023, гр. Варна (*Доклад*), 1-ва награда за най-добра презентация на докторант в сесия „ Кратки доклади"

Stoeva S, Vankova DG, Sokrateva T, Nashar M. The potential of sulfur-containing mineral water and sulfur-containing bioactive compounds to modulate inflammatory markers in human intestinal epithelial cells: a comparative study. Science and Technologies in Biomedicine, 29-31 октомври, 2025, Варна, България (*Постер*)

Стефка Стоева, Деяна Ванкова, Милена Пашева, Тодорка Сократева и Милка Нашар, „Противовъзпалителен ефект на сяра

съдържаща минерална вода и сулфорафан в липополизахарид-стимулирани човешки чревни епителни клетки: сравнително проучване“. Десета национална научна среща по биохимия 2024, Планински рехабилитационен център „ Цигов Чарк“, 04-06. 10.2024 г. (постер)

Todorka Sokrateva, **Stefka Stoeva,** Deyana Vankova, Diana Ivanova, Milka Nashar. Anti-inflammatory potential of mineral water, sulforaphane, allicin, and taurine in an in vitro model of LPS-induced inflammation. 48th ISM World Congress, 12-16 Май 2026, Баня Ковиляча, Република Сърбия (лекция по покана Т. Сократева)

Milka Nashar, Diana Ivanova, **Stefka Stoeva,** Todorka Sokrateva. Sulfur-Containing Mineral Water Modulates Redox-Regulating Gene Expression in Human Cells. 48th ISM World Congress, 12-16 Май 2026, Баня Ковиляча, Република Сърбия (*Постер*)

9 ФИНАНСИРАНЕ

Експерименталната работа по дисертационния труд е финансирана от **Медицински университет – Варна,** Фонд „Наука“, Проект № 22003 **„***Сравнително проучване биологичните ефекти на природни хранителни източници на сяра върху човешки интестинални клетки*“.