

# Подходи и методи за изследване на биологичната активност на лечебните растения

Доц. Йоана Димитрова Киселова-Кънева, д.б.

Катедра по биохимия, молекулна медицина и нутригеномика

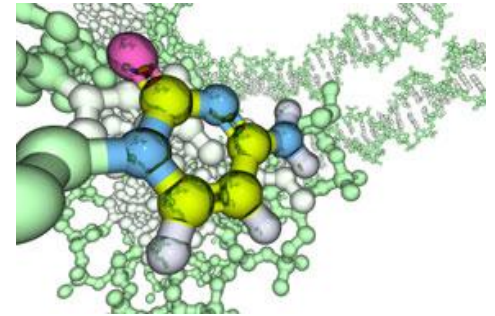
Медицински Университет “Проф. Д-р П. Стоянов”  
гр. Варна

# Народна медицина и лечебни растения

- 80% населението на Земята разчита на народната медицина за лечение
- 40% от лекарствените форми и средства са фитопрепарати
- 5-15% от известните 250 000 (500 000) вида растения са проучени за наличие на биоактивни съставки
- 21 000 лечебни растения в света
- 750 лечебни растения в България (20% от познатите 3900 висши растения)

*“Билките (лечебни растения, лечебни треви) обхващат голяма група растения, които се използват в медицинската и ветеринарномедицинската практика за профилактика и лечение на болести”. /Уикипедия/*

# Биологично активни съединения в растенията



- Полифеноли
- Алкалоиди
- Терпени
- Сапонини
- Ксантофили
- Фитостероли
- $\beta$ -глюкани
- Лектини
- Етерични масла
- Витамини
- Органични серни съединения
- Други

# Биологична активност на билките

“За всяка болка има билка”

*Българска народна поговорка*

- Противомикробно
- Противовъзпалително
- Кардиотонично
- Жлъчегонно
- Имуномодулиращо
- Диуретично
- Слабително
- Регенеративно
- и много други



# Цели на научните изследвания върху биологичното действие на лечебните растения

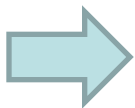
- Получаване на научни доказателства за вече установени от практиката на народната медицина ефекти
- Търсене на нови, непознати до момента, за билката ефекти
- Скрининг за наличие на желан биологичен ефект измежду група растения
- Проверка за наличие на нежелани биологични ефекти
- Изучаване на молекулните механизми, опосредяващи конкретен биологичен ефект/и
- Установяване на активните компоненти в растенията

## Форми, под които се изследват лечебните растения

- Тотални екстракти или фракции
- Изолирани чисти субстанции
- Готови форми (лекарства, хранителни добавки)

## Bioactivity-guided fractionation

- Фракциониране
- Оценка на биологичната активност
- Фракциониране
- Оценка на биологичната активност
- Изолиране на чисти субстанции
- Оценка на биологичната активност



Установяват се съединенията, на които се дължат биологичните ефекти

# Подходи за изследване на биологичната активност на билките

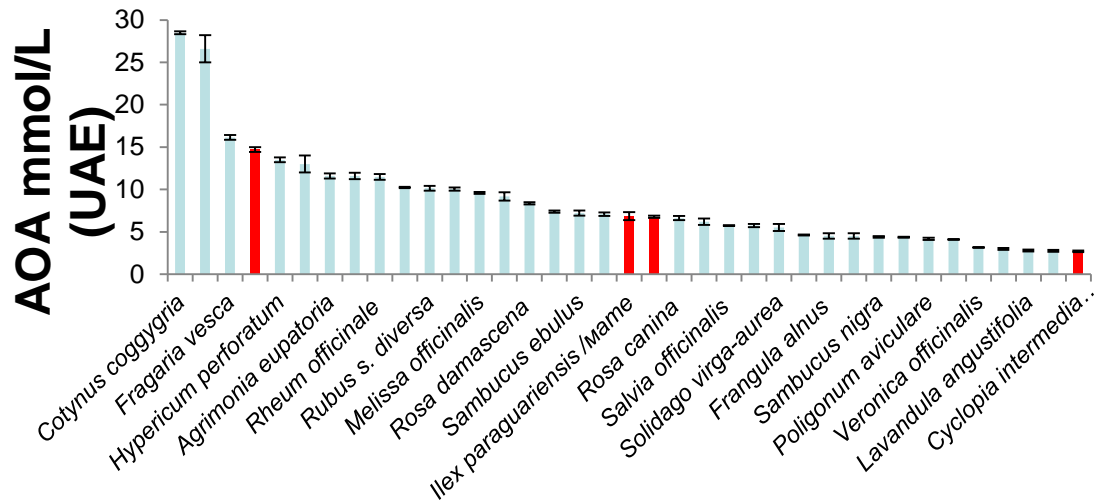
## 1. *In vitro* изследвания

# Измерване на антиоксидантна активност

- Степен на погасяване на свободни радикали в реакционната смес
  - ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid))
  - DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
  - ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)
  - SOD и каталазоподобна активност
- Инхибиране формирането на липидни пероксиди
  - $\beta$ -каротен обезцветяващ метод
- Редуцираща сила
  - FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) ( $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ )
- Хелатираща сила (свързване на  $\text{Fe}^{2+}$ )
  - Ferrous ion chelating (FIC) активност
- Предотвратяване окислението на макромолекули или надмолекулни комплекси
  - LDL комплекси
  - Микрозомни фракции
  - ДНК



## Измерване на антиоксидантна активност на екстракти от български лечебни растения чрез ABTS катион обезцветяващ метод



- повторяемост
- възпроизводимост на резултатите

### Предимства на ABTS метода

- Отчита действието както на хидрофилни, така и на липофилни съединения от изследваната проба

# Повлияване на ензимната активност

## Таргетни процеси

- Синтезата на ейкозаноиди
  - Циклооксигеназа
  - Липоксигеназа
- Храносмилане
  - $\alpha$ -амилаза,  $\alpha$ -глюкозидаза
  - липаза
- Предаване на нервен импулс
  - Ацетилхолин естераза
- Репликация
  - Топоизомераза I и II
- Синтез на меланин
  - тирозиназа
- Разграждане на пурини
  - Ксантин оксидаза

## Болест на Алцхаимер

- Глутатион-S-трансфераза
- Ацетилхолин естераза
- Карбоксил естераза
- Ксантин оксидаза

# Повлияване на ензимната активност от растителни екстракти

## Таргетни процеси

- Синтезата на ейкозаноиди
  - Циклооксигеназа
  - Липоксигеназа
- Храносмилане
  - $\alpha$ -амилаза,  $\alpha$ -глюкозидаза
  - липаза
- Предаване на нервен импулс
  - Ацетилхолин естераза
- Репликация
  - Топоизомераза I и II
- Синтез на меланин
  - Тирозиназа
- Разграждане на пурины
  - Ксантин оксидаза

## Болест на Алцхаимер

- Глутатион-S-трансфераза
- Ацетилхолин естераза
- Карбоксил естераза
- Ксантин оксидаза

## Galantamine (Nivalin)

- Обратим конкурентен инхибитор на ацетилхолин естераза

## Проф. Димитър Пасков

- принос в откриването и производството на лекарството



Блатно кокиче (*Leucojum aestivum* L.)

# Предимства и недостатъци на изследванията *in vitro*

## Предимства

- Бърз резултат
- Изследване на голям брой проби в множество повторения
- Сравнителен анализа на голям брой проби (видове екстракти)
- Бърз скрининг по отношение на определено действие

## Недостатъци

- Резултатите не винаги могат да се отнесат за живи системи

## 2. Експерименти върху живи системи

# Експерименти с клетъчни култури

## Първични клетъчни култури

- Клетки, изолирани от нормални тъкани
  - Кръв (РВМС, макрофаги, лимфоцити)
  - Биопсии
- Клетки, изолирани от тумори

## Обезсмъртени, трансформирани клетъчни линии

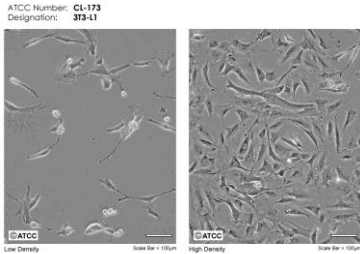
- Клетки, изолирани от нормални тъкани, вкл. кръвни клетки
- Клетки, изолирани от тумори

***Изборът на клетъчна линия зависи от търсения биологичен ефект***



# Клетъчни линии, използвани в Катедрата по биохимия, молекулна медицина и нутригеномика

## *Mus musculus* (домашна мишка)

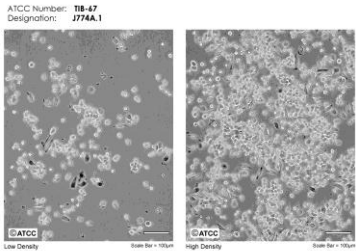


### 3T3-L1

- преадипоцити  
(модел на мастна тъкан)



*ефекти на екстракти от  
медицински растения върху  
метаболизма на мастна тъкан*



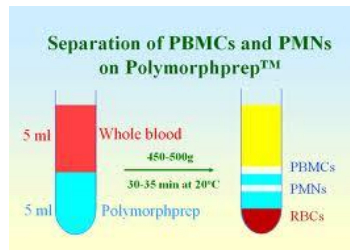
### J744A.1

- диференцирани макрофаги  
(модел на възпалителен  
отговор)



*ефекти на екстракти от  
медицински растения върху  
възпалителен отговор*

## *Homo sapiens* (човек)



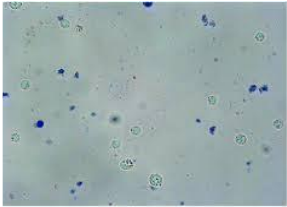
### PBMC

- лимфоцити,
- моноцити
- макрофаги



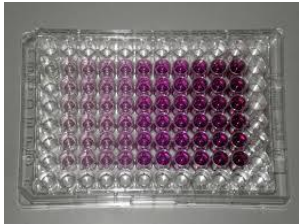
*ефекти на екстракти от  
медицински растения върху  
възпалителен отговор*

# Цитотоксичност/ цитопротективно действие на растителни екстракти



## Trypan blue exclusion assay

- Оцветяват се мъртвите клетки



## MTT (3-(4, 5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) ТЕСТ

- Оцветяват се живите клетки

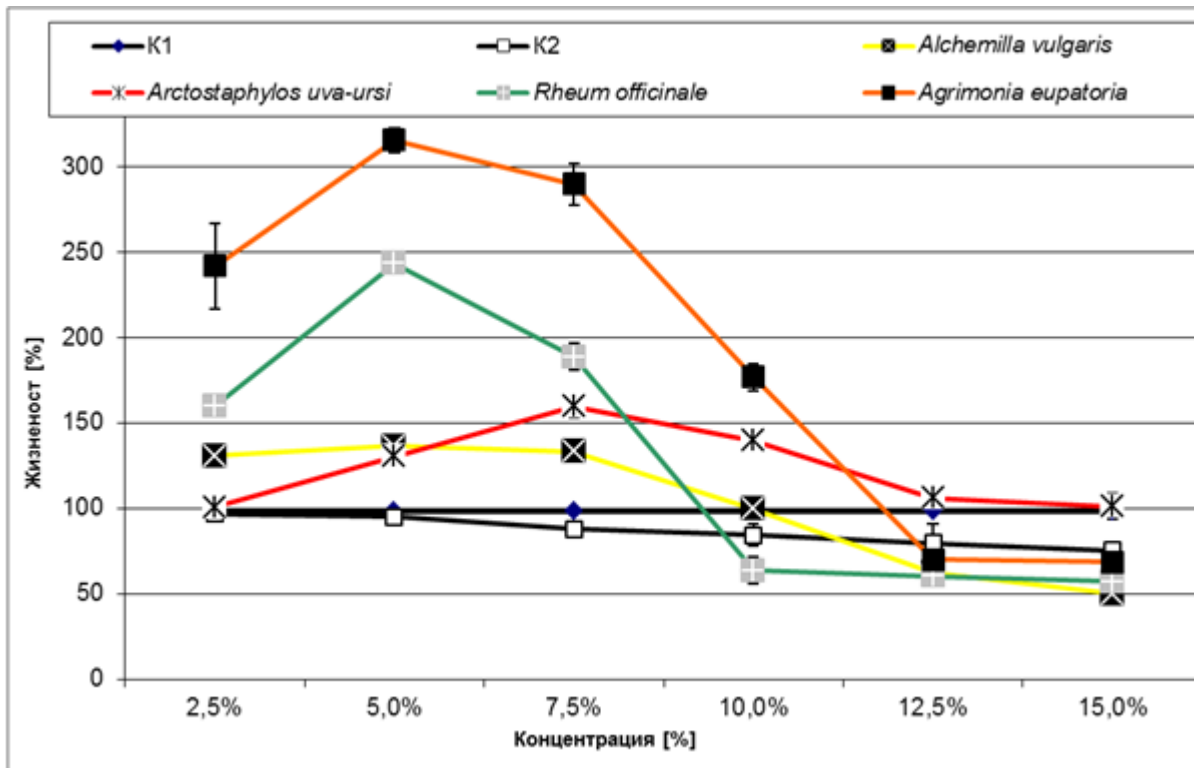


## Активност на лактат дехидрогеназа в културалната среда

- Отчита се степента на отмиране на клетки



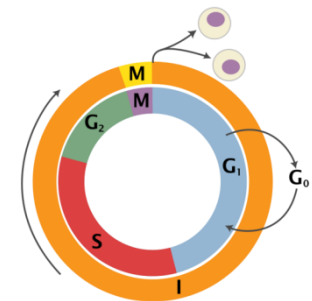
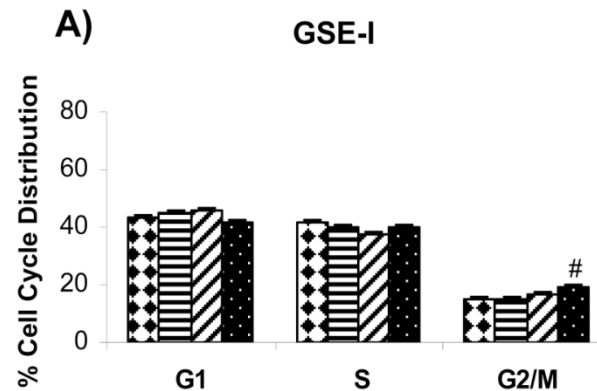
## Прилагане на МТТ тест за изследване влиянието на растителни екстракти върху жизнеността на 3Т3-L1 преадипоцити



- повторяемост
- възпроизводимост на резултатите

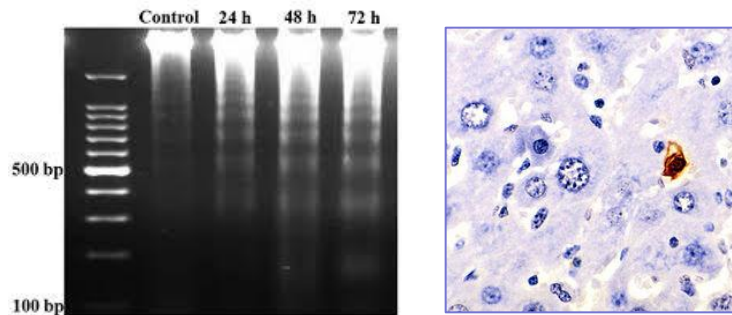
## Повлияване на клетъчния цикъл

- Такива изследвания са главно във връзка с търсене на **цитостатично** действие
- Измерва се броят на клетките в различните фази
- Използват се цитометрични методи
  - Flow цитометрия



## Повлияване на апоптозата

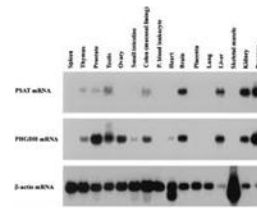
- Такива изследвания са главно във връзка с търсене на **противораково** действие
- Измерва се броят на клетките с индуцирана апоптоза
- Методи за детекция на апоптоза:
  - ДНК фузия
  - ДНК фрагментиране
  - TUNEL
  - Имунохистохимия
  - Flow цитометрия



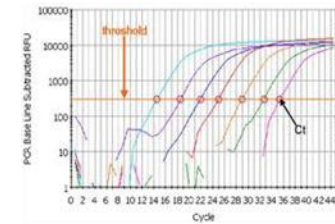
Li et al., 2013,  
*Oncology Letters*, 6: 885-90

# Повлияване на генната експресия

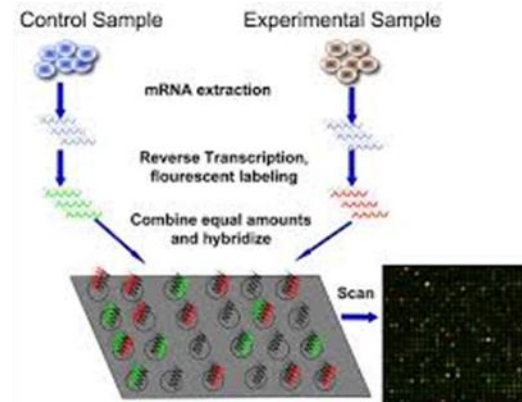
- Ниво транскрипция
  - Northern Blotting
  - Real-Time PCR
  - Microarray



Northern Blotting



Real-Time PCR



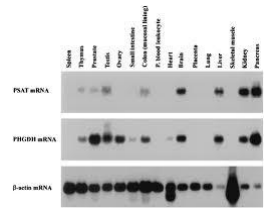
Microarray

# Повлияване на генната експресия

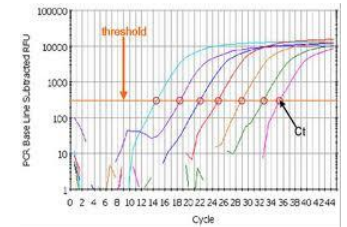
- Ниво транскрипция
  - Northern Blotting
  - Real-Time PCR
  - **Microarray**

- *Измерва се наведнъж експресията на голям брой гени*

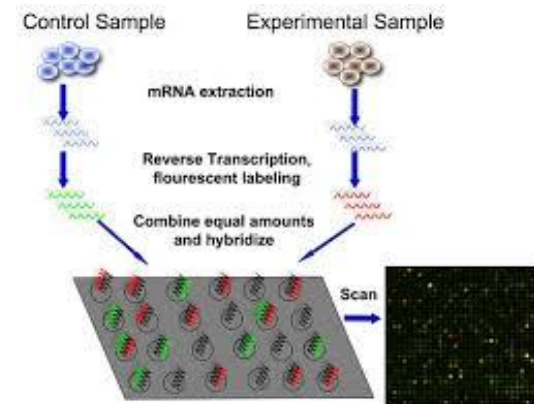
- *Получава се информация за повлияване на различни процеси*



Northern Blotting



Real-Time PCR



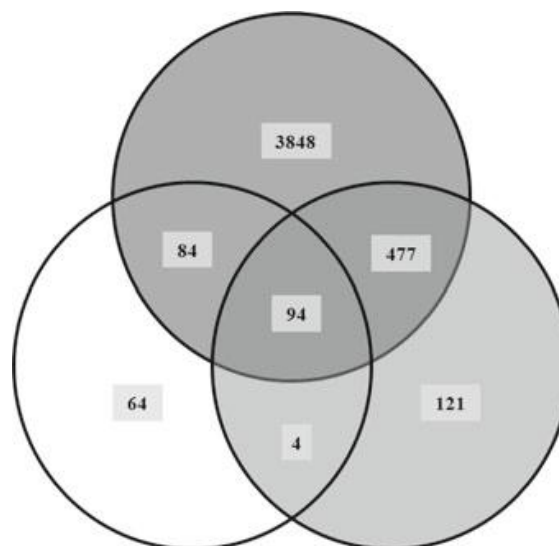
Microarray

# Влияние на екстракт от *Anacardium occidentale* (кашу)

## върху експресионния профил на HerG2 клетки

Khaleghi et al., *Genes Nutr* (2011) 6:413–427

1,7 mg/ml vs. control



0,4 mg/ml vs. control

0,6 mg/ml vs. control

# Влияние върху miRNA транскриптом

## miRNA

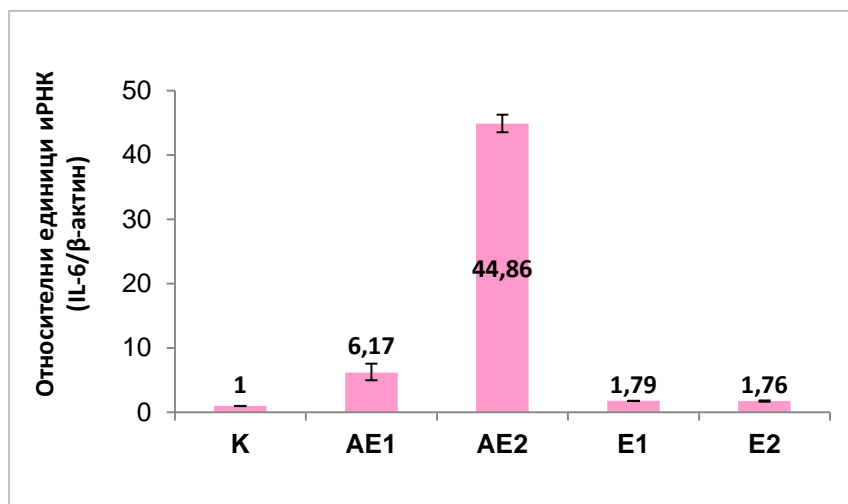
- Малки, некодиращи РНКи (~20 нуклеотида)
- Във всички живи организми, включително някои вируси
- Регулират генната експресия на транскрипционно и посттранскрипционно ниво

## Полифеноли и miRNA

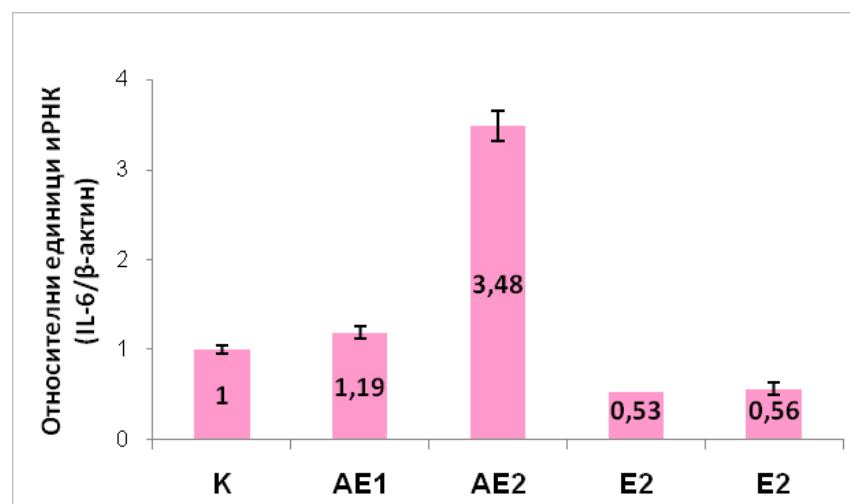
- Всички класове полифеноли могат да модулират експресията на множество miRNAs
- miRNAs показват нови механизми опосредяващи действието на полифенолите
- Таргетните miRNAs участват в регулирането на различни биологични функции
- Механизмите на повлияване са все още **неизвестни**

# Прилагане на двустъпков Real-Time PCR за изследване влиянието на екстракт от камшик (*Agrimonia eupatoria*) върху експресията на IL-6

**3T3-L1**  
преадипоцити



**J744A.1**  
макрофаги

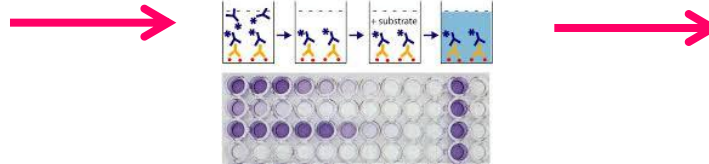
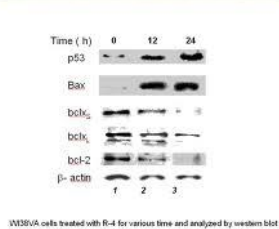


- повторяемост
- възпроизводимост



- Посттраскрипционно ниво (синтез на полипептидна верига)
  - Western blotting
  - ELISA
  - Хроматографски техники

Western blot analysis of bcl-2 family proteins



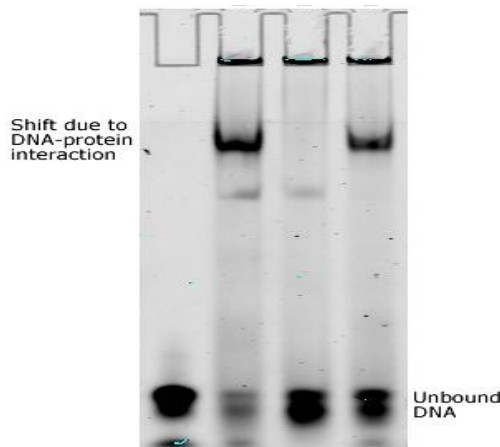
**Измерва се концентрацията на съответния протеин в клетъчни лизати или в културалната среда**

## Повлияване на сигнални пътища

- Ниво взаимодействие с рецептори
  - Използване на рецептор-специфични антитела
  - Отчитане на трансактивиране на цитозолни рецептори (PPARs)
  
- Ниво протеини от вътреклетъчния сигнален път
  - Повлияване активността на ензими от сигналните каскади
    - Електрофореза
    - Хроматографски техники
  - Повлияване концентрацията на вторични посредници
    - ELISA
    - луминисценция

## Повлияване на сигнални пътища

- Ниво транскрипционни фактори
  - концентрацията на транскрипционния фактор в ядрото
    - EMSA (electrophoretic mobility shift assay)
    - ELISA
  - степента на свързване на транскрипционния фактор с консенсусните секвенции от промотора (активност)
    - Използват се репортерни гени (луцифераза)



# Предимства и недостатъци на експериментите с клетъчни култури

## Предимства

- Дават информация за биологичното действие в живи системи
- Бърз резултат
- Изследване на много проби в повече повторения
- Сравнителен анализа на голям брой проби (видове екстракти)
- Отчитане на клетъчна специфичност по отношение на биологичния отговор
- Избор измежду голям брой видове клетъчни линии
- Скрининг по отношение на определен ефект

## Недостатъци

- Резултатите, получено на клетъчно ново не е задължително да могат да се отнесат за действието на организмово ниво
- Не се отчита бионаличността на активните компоненти от растенията

### 3. Експерименти *in vivo*

## Експерименти с опитни животни

Проследяване ефекта на растителните екстракти при:

- Здрави животни
- Модели на заболявания
  - Диабет тип I
  - Метаболитен синдром
  - Възпаление
  - Хепатотоксичност
  - Улцерогенеза
  - други



Изследвани биологични проби

- Биологични течности
  - плазма, урина, други
- Клетки
  - Еритроцити, РВМС и др. кръвни клетки
- Тъкани
  - хомогенати, хистологични препарати

## Въведени модели

Модели на:

- Метаболитен нарушения

*Agrimonia eupatoria* (камшик)



- Хепатотоксичност

*Cotinus coggygria* (смадлика),  
*Holoschoenus vulgaris*



- Улцерогенеза

*Cotinus coggygria* (смадлика)

- Остро възпаление

*Cotinus coggygria* (смадлика)



# Предимства и недостатъци на моделите с експериментални животни

## Предимства

- Получават се данни за биологичното действие *iv vivo*
- Възможност за изследване на действието във всички желани тъкани и органи
- Комплексни резултати

## Недостатъци

- Индивидуални различия на животните по отношение повлияването (по-слаба повторяемост на резултатите)
- Видови различия по отношение повлияването
- Ограничен обем на някои от изследваните проби



## 4. Интервенции

## Интервенции с участието на доброволци

### Изследвани биологични проби

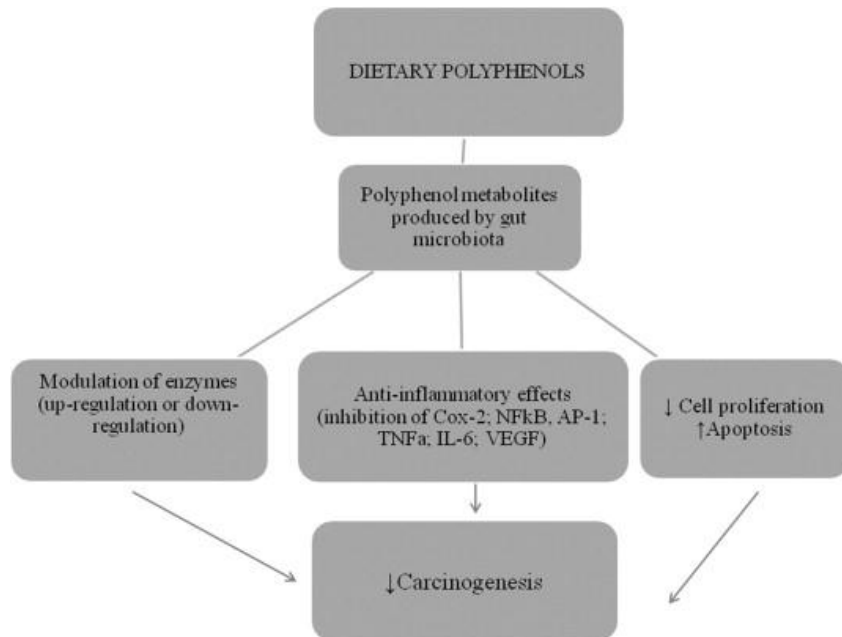
- Биологични течности
  - плазма, урина, други
- Клетки
  - Еритроцити, РВМС и др. кръвни клетки
- Тъкани
  - биопсии



# Влияние върху състава на чревната микрофлора

## Чревна микрофлора (микробиом)

- 500-1000 вида
- Брой на бактериалните клетки = 10 x броя на клетките в човешкото тяло
- Установена е връзка между видовия състав на микрофлората и някои възпалителни заболявания, затлъстяване, рак и др.
- Бързи промени в състава след в зависимост от състава на храната



Полифеноли ↔ Микробиом

## Интервенции с участието на доброволци, проведени в Катедрата по биохимия, молекулна медицина и нутригеномика

Изследвано е влиянието на приема на чай от:

- *Agrimonia eupatoria* (камшик)
- *Sambucus ebulus* (бъзак)

**Върху:**

- Антиоксидантен капацитет на плазма
- Липиден профил
- Ниво на адипокини
- Ниво на възпалителни цитокини
- Експресия на възпалителни фактори в РВМС



# Примерен алгоритъм за изследване биологичните ефекти на лечебните растения

## Изследвания *in vitro*

- първоначален скрининг
- подбор на растения за следващи изследвания



## Изследвания

### върху експериментални животни

- данни за действието *in vivo*
- установяване на неблагоприятни ефекти



## Изследвания *in vitro* върху клетъчни култури

- данни за действието в биологични системи
- скрининг
- подбор на растения за следващи изследвания



## Интервенции с участието на доброволци

- данни за действието при хора
- резултати с потвърдителен характер

**Благодаря за  
вниманието!**