

7. Kiselova, Y., **Ivanova, D.**, Chervenkov, T., Gerova, D., Galunska, B. and Yankova, T. (2006). Correlation between the In Vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs. *Phytother Res*, 20: 961-965. **IF = 1.144**
8. Kiselova, Y., **Ivanova, D.**, Galunska, B., Chervenkov, T., Gerova, D., Yankova, T. (2006). Polyphenol content and *in vitro* antioxidant activity of aqueous-alcoholic extracts from Bulgarian herbs. *Bulletin of the medical Institute after Mehrabyan* (Yerevan, Armenia), 1: 78-83.
9. **Ivanova, D.**, Gerova, D., Chervenkov, T., Yankova, T. (2005). Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*, 96 (1-2): 145-150. **IF = 1.554**
10. **Ivanova, D.**, Chervenkov, T., Gerova, D., Yankova, T. (2004). Screening Bulgarian medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Nato Sci Ser I Life*, Vol. 361: Risk infections and possibilities for biomedical terrorism, Elzer, P., Metodiev, K., (eds.), Amsterdam: IOS Press, The Netherlands, 41-48.



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

Диана Георгиева Иванова

АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ НА БЪЛГАРСКИ ЛЕЧЕБНИ РАСТЕНИЯ И СВЪРЗАНИ С НЕЯ БИОЛОГИЧНИ ЕФЕКТИ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане на научната степен „доктор на биологическите науки“ по научна специалност Биохимия

Официални рецензенти:
 Проф. д-р Емануил Гачев, д.б.н.
 Проф. д-р Майя Стойнева
 Доц. д-р Татяна Влайкова

Варна, 2013

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита на заседание на разширен катедрен съвет на Катедрата по биохимия, молекулна медицина и нутригеномика при Медицински университет – Варна, състояло се на 11 април 2013 г., и е насочен за защита пред Научно жури.

Дисертационният труд съдържа общо 394 страници, онагледен е със 109 фигури и 37 таблици. Книгописът включва 755 заглавия, от които 47 на кирилица и 708 на латиница.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 17.06.2013 г. отч. във II аудитория на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

Материалите по защитата са публикувани на интернет-страницата на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна

VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Ivanova, D.**, Vankova, D., Nashar, M. (2013). *Agrimonia eupatoria* tea consumption in relation to markers of inflammation, oxidative status and lipid metabolism in healthy subjects. *Arch Physiol Biochem*, 119 (1): 32-37. **IF = 0.479 (2011)**
2. Tasinov, O., Kiselova-Kaneva, Y., **Ivanova, D.** (2012). Antioxidant activity, total polyphenol content and anthocyanin's content of *Sambucus ebulus* L. aqueous and aqueous – ethanolic extracts depend on the type and concentration of extragent. *Science & Technologies*, 2 (1): 37-41.
3. Kiselova-Kaneva, Y., Tasinov, O., Vankova, D., **Ivanova, D.** (2012). Ethanol induces IL-6 and TNF- α cytokine and iNOS and COX-2 enzyme gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. *Scr Sci Med*, 44 (2): 31-35.
4. Павлов, Д., Нашар, М., Иванов, Д., **Иванова, Д.** (2012). In vitro антиоксидантни свойства на извлеци от смрадлика (*Cotinus coggygria*). *Известия на Съюза на учените – Варна, Серия „Медицина и екология“*, 1'2012/Том XVII, 72-76.
5. Kiselova, Y., **Ivanova, D.**, Trendafilova, A., Marinova, S., Zapryanova, Y., Todorova, M. (2011). Antioxidant activity and total phenolic content of fractions from selected Bulgarian medicinal plants. *Acta fytotechnica et zootechnica*, 1:13-16.
6. Ivanov, D., Kiselova, Y., **Ivanova, D.** (2007). *Cetraria islandica* as a natural source of antioxidants. „*Ovidius*” *University Annals of Medical Science - Pharmacy*, 5 (1): 80-83.

- разработване на диетични препоръки за профилактика на населението
19. Предоставяне на научни данни за разработване на нови здравословни продукти на растителна основа за нуждите на фармацевтичната и козметичната индустрии, както и на функционални храни и нутрацевтици за хранителната индустрия; Подкрепа развитието на местната фармацевтична, козметична и хранителна индустрия и други сходни сектори на индустрията.

СЪДЪРЖАНИЕ

СПИСЪК на често използваните съкращения.....	5
I. ВЪВЕДЕНИЕ.....	7
II. ЦЕЛ.....	9
III. ЗАДАЧИ.....	10
IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	12
1. Растения.....	12
2. Растителни извлеци и фракции.....	15
3. Определяне на антиоксидантна активност.....	19
4. Определяне концентрацията на полифеноли.....	19
5. Определяне концентрацията на антоциани.....	19
6. RP-HPLC анализ.....	19
7. Клетъчни линии.....	19
8. Субкултивиране на клетъчни култури.....	19
9. МТТ тест за цитотоксичност.....	19
10. Схеми на третиране на клетъчни култури.....	19
11. Експериментални животни.....	20
12. Изследване влиянието на билкови чайове върху здрави доброволци.....	21
13. Определяне нивото на гена експресия.....	23
14. Статистически анализ.....	25
15. Използвани реактиви.....	25
V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	
1. Антиоксидантна активност и съдържание на полифеноли в екстракти от български лекарствени растения.....	25
2. Изследване антиоксидантното действие на български лекарствени растения върху клетъчни култури.....	38
3. Изследване на биологичното действие на избрани български лекарствени растения върху модели на експериментални животни.....	73

4. Изследване на биологичното действие на избрани български лекарствени растения при здрави доброволци.....	78
VI. ИЗВОДИ.....	102
VII. СПРАВКА ЗА ОЧАКВАНИТЕ ПРИНОСИ.....	107
VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	111

11. За първи път е установено подобряване на липидния профил при здрави индивиди след продължителна консумация на чайове от *Agrimonia eupatoria* и *Sambucus ebulus*, свидетелство за потенциал на билките в профилаксиката на сърдечно-съдовите заболявания.
12. За първи път са установени нетоксични дози на водна инфузия от листата и водно-алкохолна извлек на *Cotinus coggygria*, с потенциал за приложение върху експериментални животни.
13. За първи път е доказано, че *Cotinus coggygria* проявява антиоксидантна активност при експериментални животни.
14. За първи път е установено за водно-етанолов извлек от дървесина на *Cotinus coggygria*, че проявява хиполипидемично действие при експериментални животни.
15. Настоящото изследване за първи път установи наличие на галова киселина, канелена киселина и кафеена киселина в екстракт от *Agrimonia eupatoria*. При това, галовата киселина бе в изключително висока концентрация, докато за останалите фенолни киселини бяха измерени значително по-ниски концентрации.

Практическите ползи от проучването са свързани със следното:

16. Разкриване на потенциала на българските билки като важен здравен ресурс;
17. Подчертаване значението на фитотерапията като разход-ефективен метод за профилаксика и лечение на социално значимите заболявания (диабет тип 2, сърдечно-съдови заболявания и др.);
18. Повишаване на нивото на здравните знания в областта на превенцията и грижата за здравето, с потенциален ефект: намаление на общата заболяемост на населението; Предоставяне на научни данни на заинтересованите страни с цел актуализация и

3. За първи път е установено чрез RP-HPLC анализ наличието на фенолните киселини галова, кафеена и канелена в екстракт от *Agrimonia eupatoria*.
4. За първи път е установено, че t-ButOОН в концентрации от 50μМ до 100μМ: стимулира експресията на редокс сензитивните гени GCL, GPx4, MCP-1 и IL-6 в 3T3-L1 преадипоцити; стимулира експресията на ензимите GCL и GPx4 от обмяната на глутатион и инхибира експресията на цитокините MCP-1 и IL-6 в J774A.1 макрофаги.
5. За първи път е установено, че етанолът индуцира експресията на MCP1, IL-6 и TNFα цитокините и проинфламаторните ензими iNOS и COX-2 в преадипоцити.
6. За първи път е показано, че воден извлек от *Sambucus ebulus* и водно-етанолов екстракт от *Agrimonia eupatoria* могат да повлияват експресията на редокс сензитивни гени в клетъчни култури и експериментални животни.
7. За първи път е доказано за растителен екстракт, че стимулира експресията на IL-6 в преадипоцитна клетъчна култура и в адипозна тъкан на плъхове.
8. За първи път е доказано, че извлек от *Agrimonia eupatoria* проявява противовъзпалително и имуномодулиращо действие при експериментални животни.
9. Получени са първите научни доказателства, че *Agrimonia eupatoria* и *Sambucus ebulus* повишават антиоксидантния капацитет при хора.
10. Идентифицирани са провъзпалителни маркери, върху които *Agrimonia eupatoria* има ефект, проявявайки противовъзпалително действие, както при експериментални животни, така и при хора. Получено е първо научно доказателство за противовъзпалителни свойства на камшика при хора в потвърждение на данните от народната медицина.

СПИСЪК НА ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

АЕ – екстракт от *Agrimonia eupatoria*
 АКФ – активни кислородни форми
 АОА – антиоксидантна активност
 БФ – бутанолна фракция
 ВФ – водна фракция
 ЕАФ – етилацетатна фракция
 κДНК – копи ДНК
 КП – концентрация на полифеноли
 MAP киназа – митоген активирана протеин киназа
 MAPK киназа – киназа на MAP
 MAPKK киназа – киназа на MAPK
 МДА – малонов диалдехид
 ОС – оксидативен стрес
 ПЕФ – петролиевоетерна фракция
 ПФ – полифенол
 ТБК – тиобарбитурова киселина
 ТМЕ – тотален метанолен екстракт
 ТТ – тотални тиоли
 ХФ – хлороформена фракция
 Цит Р450 – Цитохром Р450АР-1 – activator protein-1 (активаторен протеин-1)
 ARE/ErRE – Antioxidant/Electrophyl Response Element (Антиоксидант/електрофил респонсен елемент)
 CRP – C-reactive protein (С-реактивен протеин)
 DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
 GCL – γ-глутаминцистеин лигаза
 GLUT4 – глюкозен транспортър тип 4
 GPx4 – глутатион пероксидаза 4
 GS – глутатион синтетаза
 GSH – редуциран глутатион
 GSSG – окислен глутатион
 IκB – инхибитор на NF-κB
 IL-6 – интерлевкин-6
 iNOS – индуцируема NO синтаза

ЛОХ - липоксигеназа
MCP-1 – macrophage chemotactic protein (макрофажен хемотаксисен протеин)
МТТ - 3-(4,5-диметитиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид
NF- κ B – нуклеарен фактор капа В
PBS – Phosphate buffered saline (изотоничен фосфатен буфер)
PCR – polymerase chain reaction (полимеразна верижна реакция)
Real-Time PCR – PCR в реално време
RP-HPLC – Reverse phase high performance liquid chromatography (обратно фазова високоефективна течна хроматография)
RT-PCR – Reverse Transcription PCR (обратна транскрипция – PCR)
t-ButOOH – tert-butylhydroperoxide (третичен бутилов хидропероксид)
TNF- α – tumor necrosis factor alpha (тумор некрозисен фактор алфа)

- капацитет и тотални тиоли в серум на доброволци след едномесечен прием на чай
31. Консумацията на чай от *S. ebulus* доведе до значително понижаване на концентрацията на общия холестерол, LDL холестерола и ТАГ в серума на изследваните лица. В края на изследването съотношението HDL/LDL холестерол се увеличи значително.
 32. Инфузия от *A. eupatoria* проявява антиоксидантна активност като повишава общия антиоксидантен капацитет в серум на доброволци след едномесечен прием на чай.
 33. Консумацията на чай от *A. eupatoria* доведе до значително понижаване на серумите нива на IL-6.
 34. Консумацията на чай от *A. eupatoria* доведе до значително повишаване на общия холестерол и HDL холестерола в серума на изследваните лица.
 35. Установена е положителна корелация между плазмените концентрации на адипонектин и нивата на HDL холестерола, която значително се увеличи вследствие консумацията на чай от *A. eupatoria*.

VII. СПРАВКА ЗА ОЧАКВАНИТЕ ПРИНОСИ

1. За първи път е извършен скрининг на български лекарствени растения за наличие на антиоксидантна активност и съдържание на полифеноли във водни и водно-алкохолни екстракти. Показано е, че антиоксидантната активност на екстрактите се определя в най-голяма степен от общото полифенолно съдържание, които са в изключително силна зависимост предвид установената висока положителна корелация.
2. За първи път е измерено общото полифенолно съдържание и антиоксидантната активност на 40% водно-алкохолен извлек от дървесина на *Cotinus coggygia*, които са в силна корелационна зависимост.

- GRx4 в адипозна тъкан на плъхове на стандартна диета и при фруктозо-индуцирани метаболитни нарушения.
24. Извлек от *A. eupatoria* проявява антиоксидантна активност като:
 - a. повишава концентрацията на тоталните тиоли в адипозна тъкан на плъхове на фруктозна диета и индуцирани метаболитни нарушения;
 - b. понижава серумните нива на МДА при плъхове на фруктозна диета и индуцирани метаболитни нарушения.
 25. Извлек от *A. eupatoria* проявява противовъзпалителна активност като понижава нивата на С-реактивен протеин в черен дроб при животни на стандартна диета и ги нормализира при животни с фруктозо-индуцирани метаболитни нарушения.
 26. Извлек от *A. eupatoria* проявява имуномодулираща активност като повишава нивата на IL-6 в черен дроб при животни на стандартна диета.
 27. Извлек от листа на *C. coggygia* (1%) проявява антиоксидантна активност като понижава МДА в серум на плъхове при субхронично третиране. Водно-етанолов извлек от дървесина (20%) проявява антиоксидантна активност като повишава общите тиоли в серум на плъхове при субхронично третиране.
 28. Водно-етанолов извлек от дървесина на *C. coggygia* проявява хиполипидемично действие като намалява ТАГ в серум и нормализира нивата им, повишени от етанола.
 29. Установени са концентрации от воден извлек от листа и водно-етанолов извлек от дървесина на *C. coggygia*, нетоксични при субхронично приложение.

Ефекти на извлеци и екстракти от български лекарствени растения върху клинично здрави доброволци

30. Инфузия от *S. ebulus* проявява антиоксидантна активност като повишава общия антиоксидантен

I. Въведение

Традициите на народната медицина в много страни по света са съхранили хилядолетното познание за благотворното действие на билките върху здравето. Билките, наричани също лечебни, лекарствени или медицински растения, както и лечебни треви, обхващат голяма група растения, които се използват в медицинската и ветеринарномедицинската практика за профилактика и лечение на болести. В много общества храненето и грижата за здравето са неразривно свързани и много растителни видове се използват освен за лечение и за храна (Стоянов, Китанов, 1960).

Лечебните свойства на някои от растенията са били известни още преди повече от 5000 години в земите на Асирия, Египет, Индия и Китай. В своите трудове учени от древността оставят информация за билките, ползвани по тяхно време - считаният за баща на съвременната медицина Хипократ (460–377 г. пр.н.е.), Теофраст, един от знаменитите ботаници на древността (372–287 г. пр.н.е.), Диоскорид, един от основателите на фармакогнозията (ок. 40 – ок. 90 г.), древноримският лекар Гален (129–216 г.), персийският лекар и учен Абу Али ал-Хюсеин ибн Абдалах ибн Сина - Авицена (ок. 980–1037) и много други. Първи сведения за употребата на билките по българските земи датират от времето на Теофраст, който в своя труд "Изследвания върху растенията" посочва Тракия като най-богатия на лечебни треви район в тогавашния свят. Диоскорид в съчинението си "За лекарствените средства" дава подробно описание на използваните от траките билки. Данните за славяните пък сочат, че те са се ползвали предимно от лечебните свойства на някои дървесни видове - бреза, бор, върба, ела, липа, клек, ясен. "Шестоднев" на Йоан Екзарх (VII век) е един от първите източници за практиките на билколечение в българската държава. Богомилите също са били известни с уменията си на лечители с природни средства. Знанията за лечебната сила

на билките се предава от поколения на поколения, съхранява се в ритуали, писмени източници и устно предавани съвети (Ланджев, 2010). Флората на България е забележителна със своето разнообразие – познати са повече от 3900 вида висши растения (Петров, Паламарев, 1989; Кожухаров, ред. 1992; Петрова и съавт., 1999; Делипавлов и съавт., 2003;), а за поне 750 от тях се знае, че притежават лечебни свойства (Ахтаров, 1939; Китанов, 1953, 1987; Стоянов и съавт., 1967; Йорданов и съавт., 1969; Димков, 1979; Петков, 1982; Памуков, Ахтарджиев, 1989; Ахтарджиев, 1975; Юркевич, 1976; Стойчева и др. 1986, и др.).

Според Световната здравна организация днес 80% от населението на Земята разчита за лечение на народната медицина (Gurib-Fakim, 2006). Около 40% от всички лекарствени средства и форми са фитопрепарати, а лечебните видове, необходими за тяхното изготвяне, са повече от 20 000. Според доклад от 2003 година на ВСС (Американска агенция за маркетингови изследвания) една четвърт от лекарствата, които се предписват в САЩ, Канада и Европа, съдържат активни съставки получени от растения. Проучване във Великобритания показва, че 60% от населението ползва билкови препарати (Хардалова и съавт., 1994). Но въпреки широката им употреба, едва 5 до 15% от известните в света 250 000 висши растения са проучени за наличие на биоактивни съставки (<http://www.bccresearch.com/report/BIO022C.html>). Като се има предвид огромното видово разнообразие на растенията, а също така и големият брой идентифицирани съединения с растителен произход, става ясно, че лечебният потенциал на растенията е огромен и все още недостатъчно изследван. Съвременните проучвания на лечебното действие на растения, традиционно използвани в страни като Китай, Индия, страните от Южна Америка, Средиземноморието и други, са многобройни и обикновено именно богатият опит на народната медицина е служил като отправен момент за откриване на нови лечебни средства. В голямата си част

18. Установен е стимулиращ ефект върху експресията на гена за PPAR γ в клетки, култивирани в отсъствие на индуктор на възпаление, като за *A. eupatoria* и *C. cogggyria*, но не и за *S. ebulus*, този ефект се наблюдава и в условията на индуцирано възпаление (кондиционирана среда).
19. *A. eupatoria* и *C. cogggyria* проявяват противодиабетно действие като увеличават нивата на иРНК за адипонектин в преадипоцити, както в отсъствие на индуктор на възпаление, така и в условия на индуцирано възпаление, като ефектът е концентрационно зависим. Подобен, но по-слабо изразен е ефектът на *S. ebulus*.
20. Ефектът на *A. eupatoria* и *C. cogggyria* върху експресията на проинфламаторните цитокини и маркерите за противодиабетна активност, разкрива потенциала на двете билки да повлияват механизмите свързани с изява на инсулинова резистентност по два начина – директен ефект върху експресията на PPAR γ и адипонектин и индиректно, инхибирайки факторите, поддържащи нискостепенното възпаление, съпътстващо метаболитните нарушения при диабета.

Ефекти на извлекци и инфузии от български лекарствени растения върху експериментални животни

21. Извлек от *A. eupatoria* стимулира експресията на GCL в адипозна тъкан на плъхове на стандартна диета и при фруктозо-индуцирани метаболитни нарушения.
22. Извлек от *A. eupatoria* проявява имуномодулиращо действие като стимулира експресията на IL-6 в адипозна тъкан на плъхове на стандартна диета и при фруктозо-индуцирани метаболитни нарушения.
23. Извлек от *A. eupatoria* проявява антиоксидантна активност, като инхибира експресията на MCP-1 и

- с. проявява антиоксидантни свойства, като инхибира експресията на GPx4 в нестимулирани макрофаги.
11. Воден извлек от *S. ebulus* индуцира експресията на GCL в нестимулирани преадипоцити и проявява антиоксидантна активност като понижава стимулиращия ефект на t-ButOON върху експресията на GCL и GPx-4 в условия на оксидативно стимулиране.
 12. Претретиране на 3T3-L1 преадипоцити с АЕ и SE и на J774A.1 макрофаги с АЕ намалява стимулиращия ефект на оксиданта върху експресията на GPx4.
 13. В условия на оксидативно стимулиране водно-етанолов извлек от *A. eupatoria* проявява антиоксидантна активност като:
 - 9.1. понижава стимулиращия ефект на t-ButOON върху експресията на MCP-1 в преадипоцити и GCL в макрофаги;
 - 9.2. неутрализира инхибиращото действие на t-ButOON върху експресията на IL-6 в макрофаги.
 14. Воден извлек от *Sambucus ebulus* проявява антиоксидантна активност като понижава стимулиращия ефект на t-ButOON върху експресията на MCP-1 в преадипоцити в условия на оксидативно стимулиране.
 15. Етилацетатна фракция от *Cotinus coggygria* стимулира експресията на проинфламаторни цитокини в преадипоцити.
 16. В присъствие на индуктор на възпалението и трите билки проявяват противвъзпалително действие като оказват инхибиращ ефект върху генната експресия на TNF α и IL-6, като при *C. coggygria* този ефект се наблюдава при по-ниската концентрация, докато 0.25%-ната стимулира експресията.
 17. *S. ebulus* проявява противвъзпалително действие като премахва етанол-индуцираната експресия на проинфламаторни цитокини и ензими, свързани с възпалението в претретирани с ЕА фракция преадипоцити.

тези изследвания се отнасят до антиоксидантните свойства на съединенията, съдържащи се в различен вид екстракти приготвяни от растителен материал, а антиоксидантните свойства се свързват с лекуване на възпалителни заболявания с различна етиология. Проучването на връзките между съществуващите емпирични данни от народната медицина и механизма на лечебното действие на растенията се подпомага от нарасналите възможности на съвременните медикобиологични изследвания и клинични проучвания. Необходимостта от точна научно обоснована информация за действието на лечебните растения става все по-остра и във връзка с рисковете от некомпетентното им използване (Николов, отг. ред., 2007). Проучване опита на българската народна медицина включва анализи на химичния състав, биохимичните свойства и фармакологичната активност на растящите у нас лечебни растения, както и научна обосновка на възможностите за тяхното практическо използване. До момента няма данни за системно изследване на лечебните растения, намиращи приложение в българската народна медицина по отношение на техния антиоксидантен потенциал и свързаните с него биологични активности.

II. Цел

Изследване на антиоксидантната активност и свързаните с нея биологични ефекти на избрана група от най-популярните български лечебни растения при прилагане на различни подходи:

- 1) Експерименти *in vitro* за определяне на антиоксидантна активност и фитохимичен състав на различни извлекци, екстракти и техни фракции;
- 2) Експерименти при използването на модели на клетъчни култури и *in vivo* модели, включващи експериментални животни и хора.

III. ЗАДАЧИ

1. Да се определи *in vitro* антиоксидантна активност на водни и водно-алкохолни екстракти от български лечебни растения.
2. Да се определи концентрацията на полифеноли във водни и водно-алкохолни екстракти от избраните растения и степента на корелация с антиоксидантната им активност.
3. Въз основа на резултатите от задача 1 и 2 да се избере група растения с най-висока антиоксидантна активност и концентрация на полифеноли в техните екстракти и:
 - 3.1. Да се определи *in vitro* антиоксидантна активност на различни видове фракции от избраните растения;
 - 3.2. Да се определи концентрацията на полифеноли в различни видове фракции от избраните растения.
4. От селектираната група да се изберат растения, чиито най-активни извлекци, екстракти и фракции да бъдат изследвани за антиоксидантно действие върху модели на клетъчни култури, експериментални животни и хора, като се проследи влиянието им върху:
 - 4.1. експресията на редокс сензитивни гени в:
 - нестимулирани и оксидативно стимулирани 3T3-L1 преадипоцити и J774A.1 макрофаги;
 - адипозна тъкан на плъхове на нормална диета и в модел на индуцирани метаболитни нарушения.
 - 4.2. маркери за оксидативен статус в серум и тъкани на плъхове на нормална диета и в модел на индуцирани метаболитни нарушения;
 - 4.3. маркери за оксидативен статус в серум и еритроцити при здрави доброволци, участвали в интервенция с билкови чайове.
5. Да се изследва противовъзпалително действие на растения с най-висока антиоксидантна активност върху модели на клетъчни култури, експериментални животни
6. Етанолът в нарастваща концентрация от 0,125 до 0,625% води до дозозависимо намаляване на 3T3-L1 клетъчната жизнестойност, като в концентрация от 0,625% е причина за смъртност на половината от клетките в културата.
7. Растителните екстракти повлияват различно жизнестойността на клетките: когато се прилагат в ниски дози, повечето имат стимулиращ ефект върху пролиферацията (*Cotinus coggygria*, *Alchemilla vulgaris*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Rheum officinale*, *Sambucus ebulus*, *Agrimonia eupatoria*, *Cydonia vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Rubus* sp. *diversa*, *Melissa officinalis*); Първоначалното стимулиране обичайно е последвано от намаляване на жизнестойността с увеличаване на концентрацията на екстракта. Други (от *Fragaria vesca* и *Hypericum perforatum*) понижават клетъчната жизнестойност, без да индуцират първоначалното ѝ стимулиране.
8. t-ButOОН, приложен в концентрации от 50μM до 100μM:
 - a. стимулира експресията на GCL и GPx4 в преадипоцити и макрофаги;
 - b. стимулира в преадипоцити и инхибира в макрофаги експресията на проинфламаторните цитокини.
9. Етанолът, приложен в концентрации от 2,5 до 5%:
 - a. стимулира експресията на GCL и GPx4 в преадипоцити и стимулира експресията на GCL и понижава тази на GPx4 в макрофаги;
 - b. индуцира експресията на проинфламаторни цитокини MCP1, IL-6 и TNFα и ензими, свързани с възпалението iNOS и COX-2 в преадипоцити.
10. Водно-етанолов екстракт от *A. eupatoria*:
 - a. индуцира експресията на GCL и IL-6 в нестимулирани преадипоцити и макрофаги;
 - b. проявява антиоксидантни свойства, като инхибира експресията на MCP-1 в нестимулирани преадипоцити и макрофаги;

съдови заболявания и др.). Данните от настоящото проучване могат да послужат при актуализация и разработване на диетични препоръки за профилактика на населението, както и за повишаване на нивото на здравните знания в областта на превенцията и грижата за здравето за намаляването на общата заболяемост на населението.

VI. ИЗВОДИ

Антиоксидантна активност и фитохимичен състав на български лекарствени растения

1. Антиоксидантната активност и концентрацията на полифеноли в екстрактите от повечето от изследваните български лечебни растения са по-високи или съизмерими с тези на избраната група референтни растения.
2. Антиоксидантната активност на извлеките и екстрактите се дължи в най-голяма степен на съдържанието на фенолни съединения – доказана висока степен на корелация ($r > 0,90$).
3. Фракционният анализ на групата от 11 вида български лечебни растения показва най-висока АОА, КП и степен на корелация между тези два показателя в етилацетатната, бутанолната и тоталната метанолна фракция.
4. В екстракт от *Agrimonia eupatoria* се съдържат фенолните киселини галова, кафеена, канелена и хлорогенова киселина.

Ефекти на извлекци и екстракти от български лекарствени растения върху клетъчни култури

5. Третиране с нарастващи концентрации на t-ButOОН постепенно понижава жизнеността на 3T3-L1 преадипоцити, докато върху J774A.1 макрофаги има първоначално стимулиращ ефект, последван от инхибиращо действие.

и здрави доброволци, като се определи влиянието им върху:

- 5.1. експресията на проинфламаторни цитокини и ензими, свързани с възпалението в:
 - нестимулирани и оксидативно стимулирани 3T3-L1 преадипоцити и J774A.1 макрофаги;
 - нестимулирани 3T3-L1 преадипоцити и в 3T3-L1 преадипоцити в присъствие на индуктор на възпаление (кондиционирана среда).
- 5.2. нивата на проинфламаторни цитокини в серум и тъкани на животни, както и генната експресия на такива в тъкани на животни на стандартна диета и при модел на индуцирани метаболитни нарушения.
- 5.3. нивата на проинфламаторни цитокини в серум при здрави доброволци, участвали в интервенция с билкови чайове.
6. Да се изследва противодиабетно действие на растения с висока антиоксидантна и противовъзпалителна активност върху модели на клетъчни култури, експериментални животни и здрави доброволци чрез проучване на:
 - 6.1. влиянието им върху експресията на гена за пероксизом пролифератор-активиращ рецептор гама (PPAR γ) и гена за адипонектин в нестимулирани 3T3-L1 преадипоцити и в 3T3-L1 преадипоцити в присъствие на индуктор на възпаление (кондиционирана среда);
 - 6.2. хиполипидемично действие при субхронично третиране на опитни животни;
 - 6.3. влиянието им върху липидния и глюкозния метаболизъм при здрави доброволци, участвали в интервенция с билкови чайове.

IV. Материали и методи

1. Растения

В настоящото изследване са включени 60 растителни вида, естествено срещащи се в България (табл. 1). Видовете са подбрани на базата на тяхното традиционно използване и начин на приложение: с предпочитание към такива с вътрешно приложение и по изключение с преобладаваща външна употреба. Някои от тези растения са ценени за техните декоративни свойства и/или употреба като билкови хранителни добавки и подправки.

Таблица 1. Български лечебни растения, включени в проучването.

Семейство/Вид	Популярно наименование	Част от растението, използвана в проучването
Anacardiaceae		
<i>Cotinus coggygria</i> Scop.	смадлика	листа
Apiaceae		
<i>Apium graveolens</i> L.	целина	листа
Asteraceae		
<i>Arctium lappa</i> L.	репей	корени
<i>Achillea millefolium</i> L.	бял равнец	цветове
<i>Artemisia dracunculus</i> L.	естрагон	листа
<i>Calendula officinalis</i> L.	невен	цветове
<i>Cichorium intybus</i> L.	синя жлъчка	корени
<i>Helichrysum arenarium</i> (L.) Moench	жълт смил	цветове
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	лайка	цветове
<i>Onopordon acanthium</i> L.	магарешки бодил	цветове
<i>Solidago virgaurea</i> L.	златна пръчица	стрък
<i>Taraxacum officinale</i> F.H.Wigg	глухарче	стрък
Berberidaceae		
<i>Berberis vulgaris</i> L.	кисел трън	плодове

фармацевтични препарати с противовъзпалително и/или антиобезитно/антидиабетно действие. Липсата на дефинитивни научни доказателства за биологичното действие на *Agrimonia eupatoria*, *Sambucus ebulus* и *Cotinus coggygria* обоснова избора им като обект на едно по-задълбочено проучване за антиоксидантно действие и свързаните с него биологични активности. Селектираните растения, притежаващи най-висок антиоксидантен потенциал и съдържание на полифеноли, с обещаващо най-мощно противовъзпалително и евентуално противодиабетно действие са изследвани в модели на живи системи, включващи клетъчни култури, експериментални животни и хора. Резултатите от проведените проучвания демонстрират убедително високия антиоксидантен потенциал на *C. coggygria*, *S. ebulus* и *A. eupatoria*. Резултатите от настоящото изследване представят убедителни свидетелства за противовъзпалителното действие и противодиабетен потенциал на тези растения. Получените резултати и библиографска справка дават основание да приемем, че *Agrimonia eupatoria*, *Sambucus ebulus* и *Cotinus coggygria* представляват особен интерес за по-нататъшно проучване на молекулните механизми на тяхното биологично действие с цел използването им като потенциален източник за разработването на нови фармацевтични средства с антиоксидантно, противовъзпалително и противодиабетно действие. Представен е един цялостен модел на проучване на ефекта на храни/лечебни препарати от *in vitro* до изследвания върху *in vivo* системи, приложим в съвременните научни изследвания в областта на храненето. Настоящото проучване отразява съвременни направления на нутригеномиката и фармакогеномиката и е първо по рода си в България.

Представеният обем от научни доказателства разкрива на потенциала на българските билки като важен здравен ресурс. Подчертава значението на фитотерапията като разход-ефективен метод за профилактика и лечение на социално значимите заболявания (диабет тип 2, сърдечно-

холестерол е маркер за подобрен здравен статус по отношение на метаболитен синдром и сърдечно-съдови заболявания (Ryo et al., 2004; Riestra et al., 2011). Резултатите получени в настоящото изследване могат да бъдат разглеждани като допълнение към вече установения потенциал на *A. eupatoria* да подобрява фактори с прогностична стойност за метаболитни нарушения и сърдечно-съдови заболявания. Продължителността на проучването, както и добрият здравен статус на участниците могат да са предпоставки, определящи умерения ефект на билката върху нивата адипонектин и лептин.

Резултатите, представени в това първо по рода си изследване ефектите на чай от камшик при хора, разкриват потенциала на растението да повлиява благотворно маркерите на липидния метаболизъм, оксидативния статус и възпалението при здрави възрастни индивиди.

Заклучение

Настоящото проучване представлява първият по рода си целенасочен скрининг на български лечебни растения с антиоксидантно действие. В сравнителен анализ с четири референтни растения от чужд произход с доказан антиоксидантен потенциал и лечебни свойства е проучен антиоксидантният потенциал и полифенолно съдържание на 60 естествено срещащи се в България растения, най-широко използвани в ежедневието на хората за лечение и като храна. Установено е, че значителна част от изследваните български билки имат висока антиоксидантна активност, която корелира със съдържанието им на полифеноли. Изследвани са различни извлеци, екстракти и фракции – от една страна с предпочитание към такива, препоръчвани от народната медицина и традиционната употреба, от друга – екстракти и фракции с максимално съдържание на биологично-активни съединения. Идентифицирана е група от 11 български лекарствени растения, за които данните за биологичната активност и фитохимичния състав предполагат, че биха могли да послужат като основа за

Betulaceae		
<i>Betula</i> sp.	бреза	листа
<i>Populus alba</i> L.	бяла топола	
Boraginaceae		
<i>Pulmonaria officinalis</i> L.	медуница	листа
Brassicaceae		
<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medik.	овчарска торбичка	стрък
Cannabinaceae		
<i>Humulus lupulus</i> L.	хмел	цветове
Caprifoliaceae		
<i>Sambucus ebulus</i> L.	бъзак	плодове
<i>Sambucus nigra</i> L.	бъз	цветове
Ericaceae		
<i>Arctostaphylos uva ursi</i> (L.) Spreng	мечо грозде	листа
<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	черна боровинка	листа, плодове
Fabaceae		
<i>Astragalus glycyphyllos</i> L.	клинавиче	стрък с плодове
<i>Galega officinalis</i> L.	жаблек	стрък
Geraniaceae		
<i>Pelargonium roseum</i> Willd	индрише	листа
Hypericaceae		
<i>Hypericum perforatum</i> L.	жълт кантарион	стрък
Juglandaceae		
<i>Juglans regia</i> L.	орех	листа
Lamiaceae		
<i>Ononis spinosa</i> L.	бодлив гръмотрън	
Liliaceae		
<i>Asparagus officinalis</i> L.	зайча сянка	стрък
<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	лавандула	цветове
<i>Melissa officinalis</i> L.	маточина	листа
<i>Mentha piperita</i> L.	мента	листа
<i>Mentha spicata</i> L.	джоджен	листа
<i>Ocimum basilicum</i> L.	босилек	листа

<i>Origanum vulgare</i> L.	риган	стрък
<i>Salvia officinalis</i> L.	градински чай	листа
<i>Sideritis scardica</i> Griseb.	пирински чай	стрък
<i>Thymus sp. diversae</i>	мащерка	стрък
Moraceae		
<i>Morus nigra</i> L.	черница	листа
Parmeliaceae		
<i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach.	исландски лишай	талус
Plantaginaceae		
<i>Plantago major</i> L.	жиловляк	листа
Poaceae		
<i>Zea mays</i> L.	царевица	коса
Polygonaceae		
<i>Polygonum aviculare</i> L.	пача трева	стрък
<i>Rheum officinale</i> Baillon.	ревен	корен
Rhamnaceae		
<i>Frangula alnus</i> Mill.	зърнастец	кора
Rosaceae		
<i>Alchemilla vulgaris</i> L.	цариче	стрък
<i>Agrimonia eupatoria</i> L.	камшик	стрък
<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	глог	плодове, листа и цветове
<i>Cydonia vulgaris</i> Pers.	дюля	листа
<i>Fragaria vesca</i> L.	горска ягода	листа
<i>Prunus spinosus</i> L.	трънка	плодове, цветове
<i>Rosa canina</i> L.	шипка	плодове
<i>Rosa damascena</i> L.	маслодайна роза	венчелистчета
<i>Rubus sp. diversae</i>	къпина	листа
Scrophulariaceae		
<i>Euphrasia officinalis</i> L.	очанка	стрък
<i>Veronica officinalis</i> L.	великденче	стрък
Tiliaceae		

В концентрациите на TNF α също не бяха наблюдавани специфични отклонения, с изключение на факта, че след края на изследването при всички участници стойностите на този маркер бяха под детектируемото ниво на метода. Това кореспондира с установените високи нива на антиоксидантна активност, измерени в края на изследването, отчитайки факта че TNF α е свързан с активирането на редокс чувствителни гени, посредством NF- κ B (Lastra et al., 2006). Като цяло всички тези данни се подкрепят и от факта, че всички участници в изследването са здрави и без затлъстяване.

Въз основа на експериментални данни, предполагащи антидиабетен потенциал на камшика (Gray et al., 1998; Swanston-Flatt et al., 1990; Bratоеva et al., 2010) изследвахме промените в нивата на адипонектин и лептин след 30 дневна консумация на чай от билката. Адипонектин и лептин се проследяват като прогностични маркери за дислипидемия, затлъстяване и диабет. Понижените нива на адипонектин са независим рисков фактор за развитие на атеросклероза, затлъстяване, метаболитен синдром и диабет тип 2 (Renaldi et al., 2009). Доказана е позитивна корелация между високите плазмени нива на лептин със състояния като затлъстяване и метаболитен синдром (Ntyintyane et al., 2009), а прилагането му се асоциира с увеличени нива на CRP, свидетелстващи за провъзпалителен ефект на хормона (Steffes et al., 2006). От друга страна беше установена негативна корелация между нивата на IL-6 и адипонектин, допълваща данните за връзката между адипокините и маркери на възпалението. Въпреки, че в нашето изследване суплементирането с чай от камшик не доведе до статистически значимо увеличение на плазмените нива на адипонектин, концентрацията му позитивно корелира с тази на HDL холестерола, като след края на изследването тази корелация дори се увеличава.

Много автори представят неоспорими доказателства, че корелацията между нивата на адипонектин и подобрения липиден профил, включително повишени нива на HDL

В народната медицина камшикът се използва основно заради неговите противовъзпалителни свойства (Памуков, Ахтарджиев, 1989; Fabricant and Farnsworth., 2001; Cakilcioglu and Turkoglu, 2010). Противовъзпалителната активност на билката е демонстрирана чрез инхибиторния ефект, който има върху синтезата на провъзпалителни цитокини като TNF α , IL-1 β и IL-6 в миши клетъчни култури (Bae et al., 2010). Цитокини като TNF α и IL-6 имат съществена роля в отключването и предаването на възпалителния отговор. Освен това, ролята на TNF α в индукцията на про-възпалителни гени се свързва с хронични заболявания като диабет тип 2 и атеросклероза (Fernández-Sánchez et al., 2011).

В нашето изследване серумните нива на IL-6 значително се понижиха след 30 дневната консумация на чай от агримония. Този ефект е първото научно доказателство за противовъзпалителни свойства на камшика при хора в потвърждение на данните от народната медицина. Противовъзпалителния ефект на чая също би могъл да се отдаде на ролята на полифенолите в него. В различни изследвания е показано, че диета богата на полифеноли се свързва с ниски нива на маркери на възпалението в кръвта, такива като CRP, IL-6 и TNF α (Nanri et al., 2008; Salas-Salvado et al., 2008; Holt et al., 2009). Полифенолното съдържание на водно-алкохолните екстракти от *A. eupatoria* включва процианиди, кемпферолови и кверцетинови гликозиди, за които е известно, че притежават антиоксидантни свойства (Correia et al., 2006).

Нивата на IL-6 в циркулацията корелират с ИТМ, инсулиновата резистентност и глюкозния интолеранс (Lastra et al., 2006). Освен това се смята, че този цитокин е отговорен за освобождаването на CRP от хепатоцитите (Heinrich et al., 1990; Ridker et al., 2000). В съответствие с понижените нива на IL-6, в концентрациите на CRP не се установиха промени след периода на третиране и те останаха в референтни граници.

<i>Tilia platyphyllos</i> Scop.	липа	цветове
Urticaceae		
<i>Urtica dioica</i> L.	коприва	стрък
Valerianaceae		
<i>Valeriana officinalis</i> L.	дилянка	корен
Verbenaceae		
<i>Verbena officinalis</i> L.	лечебна върбинка	стрък

Таблица 2. Референтни растителни видове, включени в проучването

Растителен вид	Популярно наименование	Част от растението, използвана в експериментите
Aquifoliaceae		
<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.	мате	листа
Theaceae		
<i>Camelia sinensis</i> Kuntze	черен чай	листа
Fabaceae		
<i>Aspalathus linearis</i> (N.L.Burm.) R. Dahlgr.	ройбос	листа
<i>Cyclopia intermedia</i> E. Mey	ханибуш	листа

2. Растителни извлекци и фракции

Водни извлекци за измерване на антиоксидантна активност и концентрация на полифеноли

Растителните екстракти се приготвят под формата на инфузии с вода: 1 грам сух растителен материал се залива с 200 мл кипяща вода и се оставя да престои съгласно рецептата за традиционна употреба, филтрува се.

Водно-алкохолни екстракти за измерване на антиоксидантна активност и концентрация на полифеноли

Водно-метанолови екстракти

Смленият изсушен растителен материал се екстрахира трикратно по три минути при непрекъснато разбъркване, на стайна температура с 80% метанол при съотношение растителен материал:метанол = 1:20 w/v. Супернатантите от всяка стъпка се обединяват и доливат до 25 мл с 80% метанол.

Водно-етанолови екстракти

150 mg смлян изсушен растителен материал се екстрахира трикратно за по три минути при непрекъснато разбъркване, на стайна температура с 40% разтвор на етанол (или с друга концентрация, където е указано). При всяко екстрахиране е спазено съотношението 1g растителен материал на 20ml екстрагент. Супернатантите от всяка от екстракционните стъпки се обединяват и довеждат до общ обем 15ml с 40% етанол.

Извлек от дървесина

Проба от дървесината се внася в 40% етанол и престояват в тъмна стъклена бутилка в продължение на 90 дни.

Водно-алкохолни екстракти за третиране на клетъчни култури

Следвана беше същата процедура, както при получаването на 40% водно-етанолни екстракти, но като екстрагент беше използван 40% разтвор на етанол в PBS (pH=7.4).

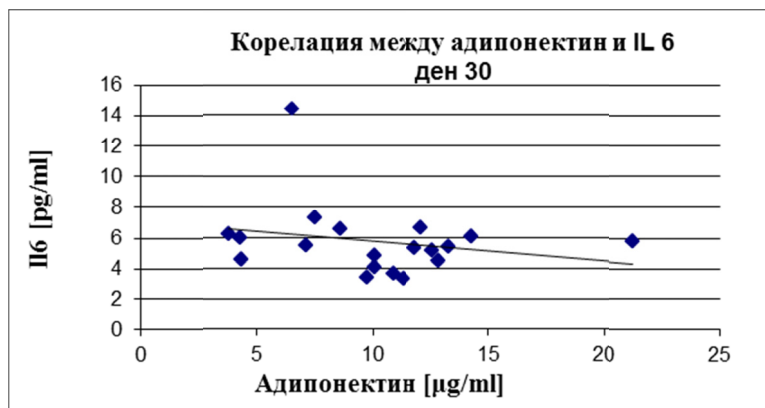
Водно-алкохолен екстракт от *AE* за третиране на експериментални животни

Полученият екстракт беше изпаряван във вакуумно-ротационен изпарител. Сухият остатък беше разтворен във вода – за група животни на стандартна диета + екстракт от *Agrimonia eupatoria* (СД+АЕ), или в 12,5% фруктозен

плазмени липиди останаха в референтните граници до края на изследването. В същото време, докато в стойностите на HDL холестерола се наблюдаваше увеличение след 30 дневна консумация на чай от камшик, LDL холестерола остана непроменен. Увеличените нива на HDL холестерола е благотворен ефект на растението, който не е докладван до сега. Ниските нива на HDL холестерол се разглеждат като независим маркер за повишен риск от сърдечносъдови заболявания (Watson, 2008) и в този смисъл, представеният по-горе резултат разкрива, че камшикът има потенциал при профилактиката на тези заболявания.

Може да се предполага, че полифенолите имат роля в механизма, по който се проявява ефекта на билката върху нивата на плазмения HDL холестерол. Известно е, че диета богата на полифеноли може да подобри липидния профил, както при здрави, така и при индивиди с компрометиран здравен статус (Baba et al 2007a; Marnewick et al., 2011).

Резултатите от измерените плазмени концентрации на SH групи показаха значително намаляване на нивата на този показател след 30 дневна консумация на чай от агримония. Вероятна причина за изчерпването на тиоловите белтъци може да е използването им при метаболизирането на полифенолите. От друга страна самите полифеноли, благодарение на антиоксидантните си свойства компенсират нуждата от синтез на SH съдържащи белтъци. За първи път в настоящото изследване беше демонстриран благотворен ефект на извлекa от камшик върху АО потенциал при хора. Беше установено значително увеличение на плазмения TAC след 30 дневна консумация на чая. Липсата на статистическа достоверност в повишените нива на FRAP в края на изследването, вероятно се дължи на различната чувствителност на двата метода в присъствието на различни антиоксиданти в серума. Установеният ефект на чая върху АО капацитет на хора е в подкрепа на данни получени в изследвания върху експериментални животни и клетъчни култури (Gião et al., 2010; Lee et al., 2010).



Фигура 37. Корелация между серумните концентрации на адипонектин и IL-6, измерени при здрави доброволци след 30 дневна консумация на чай от АЕ.

Обсъждане

В традиционната медицина чаят от АЕ се използва при възпалителни заболявания и метаболитни нарушения. Предствени са научни данни, че камшикът проявява инсулиноподобен антихипергликемичен ефект, както и че стимулира инсулиновата секреция (Gray and Flatt., 1998; Swanston-Flatt et al., 1990). Настоящото изследване включваше само здрави доброволци, с нормален въглехидратен метаболизъм и както се очакваше концентрацията на кръвната захар измерена на гладно остана в референтните граници след едномесечната консумация на извлек от камшик. Ефектът на камшик върху липидния профил е проучван в предходно наше изследване, където е показано, че прием на 40% водно-алкохолен екстракт от камшик при експериментален модел на метаболитни нарушения при плъхове предотвратява натрупването на мазнини в черен дроб и мастна тъкан, както и нормализиране на серумния липиден профил (Bratoeva et al., 2010). В настоящото изследване всички

разтвор – за групата на фруктозна диета + екстракт от *Agrimonia eupatoria* (Фр+АЕ) до първоначалния обем.

Приготвяне на воден екстракт (билков чай) за консумация от здрави доброволци

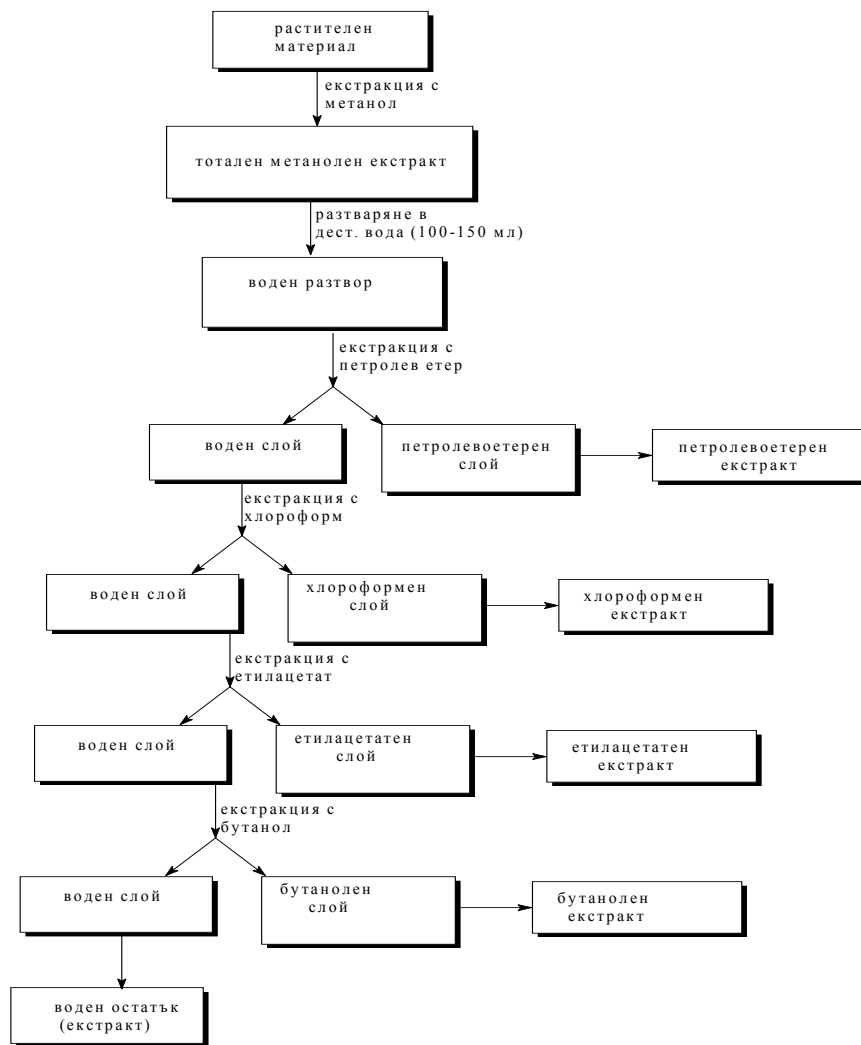
Рецептата е заимствана от българската народна медицина (Ivanova et al., 2005).

Водно-алкохолен екстракт за НР-НPLC анализ

Към 1.125 g ситно нарязана дрога са добавени 9 ml 40% разтвор на етанол, с последващо 3 минутно разбъркване на вортекс, 3 минути центрофугиране на 10 000 rpm, аспириране и отнемане на 6 ml супернатанта. Получената утайка е екстрахирана двукратно по същата схема. Сборният екстракт, възлизащ на 23.4 ml, е доведен до 50 ml с 40% разтвор на етанол.

Фракции

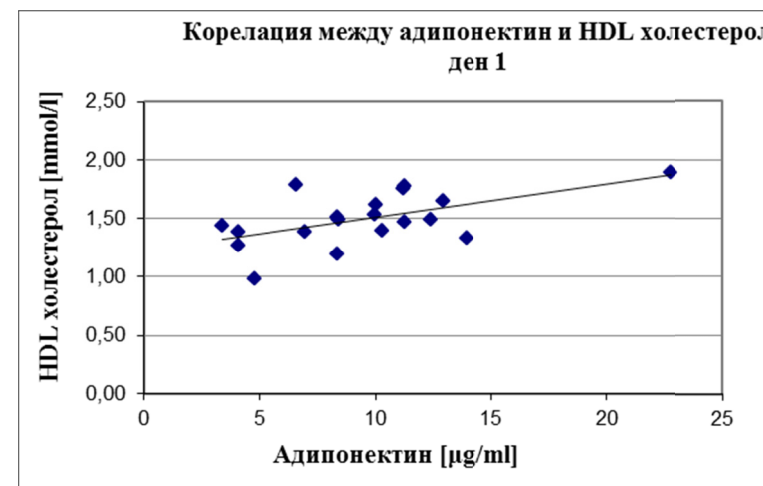
При приготвянето на материала за анализ беше следвана следната процедура за екстракция и фракциониране (Фиг. 1): изсушеният и фино смлян растителен материал се залива с абсолютен метанол в съотношение 1:20 и се екстрахира в ултразвукова вана при стайна температура в продължение на 30 мин. Полученият екстракт се филтрува и растителният материал се екстрахира още два пъти при същите условия. Трите метанолни екстракта се обединяват и разтворителят се изпарява до сухо и постоянно тегло на остатъка. Това са т. нар. тотални метанолови екстракти (ТМЕ). Последните се разтварят в дестилирана вода в съотношение 1:10 и се екстрахират последователно с различни по полярност разтворители в съотношение 1:1 с оглед получаване на фракции, обогатени на различни по полярност биологично-активни вещества (неполярни, средно полярни и полярни).



Фигура 1. Схема за получаване на различните видове фракции от изследваните растения.

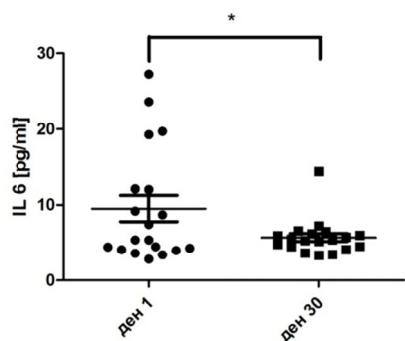
Не бяха установени статистически достоверни разлики в серумните концентрации на адипонектин преди и в края на интервенцията ($9.5 \pm 0.9 \mu\text{g/ml}$ за 1 ден и $10.1 \pm 0.9 \mu\text{g/ml}$ за 30 ден). При 58% от участниците се наблюдаваше намаляване на нивата на лептин - $4.7 \pm 0.9 \text{ ng/ml}$ за 1 ден и $2.6 \pm 0.7 \text{ ng/ml}$ за 30, въпреки че средните стойности за групата останаха без статистически достоверни разлики.

Установена беше положителна корелация между плазмените концентрации на адипонектин и нивата на HDL холестерола (фиг. 36), която значително се увеличи вследствие консумацията на чай от камшик ($r=0.57$ и $r=0.63$, за 1 и 30 ден съответно). Нивата на адипонектин корелират отрицателно с нивата на IL-6 в края на изследването – $r=-0.22$ (фиг. 37).



Фигура 36. Корелация между серумните концентрации на адипонектин и HDL холестерола, измерени при здрави доброволци след 30 дневна консумация на чай от АЕ.

Тридесет дневната консумация на извлек от АЕ доведе до статистически значимо намаляване нивата на IL-6 в серума на изследваните лица ($p < 0.05$) (фиг. 35).



Фигура 35. Концентрация на IL-6 в серум на здрави доброволци преди (ден 1) и след (ден 30) консумация на чай от АЕ. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната стойност ($*p < 0.05$, спрямо базовите стойности измерени преди началото на изследването).

Биохимичните маркери за липидния и глюкозен метаболизъм (триглицериди, общ холестерол, HDL и LDL холестерол и глюкоза) останаха в референтни граници (табл. 9). Беше установено статистически значимо увеличение на нивата на и HDL холестерола заедно с общия холестерол.

Таблица 9 Клинични показатели на участниците, консумирали чай от камшик

Показател (mmol/l)	Ден 1	Ден 30	%промяна
глюкоза	4.75 \pm 0.11	4.91 \pm 0.11	4.14
триглицериди	0.74 \pm 0.1	0.92 \pm 0.17	22.95
общ холестерол	4.32 \pm 0.18	4.69 \pm 0.15*	9.89
HDL холестерол	1.49 \pm 0.05	1.65 \pm 0.07**	12.04
LDL холестерол	2.67 \pm 0.14	2.86 \pm 0.15	7.99
Съотношение HDL/LDL	0.58 \pm 0.03	0.63 \pm 0.06	7.57

Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната стойност **($p < 0.05$, спрямо ден 1; $*p < 0.01$, спрямо ден 1).

3. Определяне на антиоксидантна активност – чрез ABTS радикал обезцветяващия метод на Re et al. (1999).

4. Определяне концентрацията на полифеноли – по спектрофотометричния метод на Singleton & Rossi (1965).

5. Определяне концентрацията на антоцианини – чрез спектрофотометричен рН-диференциален метод на Giusti & Wrolstad (2001).

6. RP-HPLC анализ – по стандартизиран метод от фармакопеята на САЩ (USP/NF, 2007).

7. Клетъчни линии

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

J744A.1 е моноцитно-макрофажна миша (*Mus musculus*) клетъчна линия. Клетките са с макрофажна морфология и са диференцирани.

8. Субкултивиране на клетъчни култури

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

9. МТТ тест за цитотоксичност – по метода на Mosmann (1983).

10. Схеми на третиране на клетъчни култури

Цитотоксичност

0-ев час: посяване на клетъчната култура; **24-ти час:** третиране с t-ButOОН или растителен екстракт; **44-ти час:** МТТ тест.

Определяне нивото на генна експресия

0-ев час: посяване на клетъчната култура; **24-ти час:** претретиране с растителен екстракт; **48-ми час:** третиране със 100 μ M t-ButOОН; **72-ри час:** изолиране на РНК.

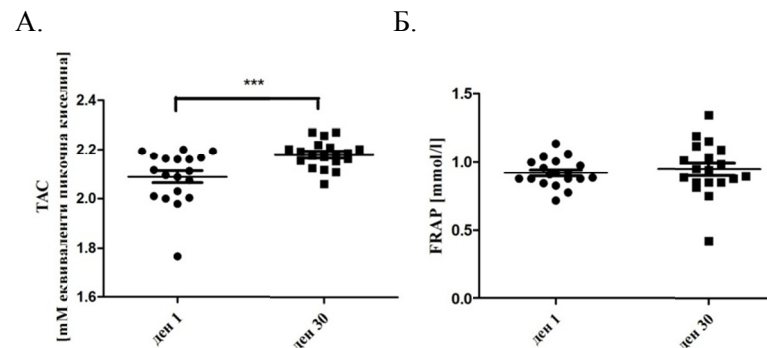
11. Експериментални животни

Всички процедури, свързани с отглеждането и третирането на опитните животни, са в съответствие с международните норми, които са възприети в България и са одобрени от Комисията по етика на научните изследвания при Медицински Университет „Проф. Д-р Параскев Стоянов” – Варна МУ-Варна (ЕЕС Council Directive 86/609, IL 358, 1, December 12, 1987). За провеждане на опитите са получени Разрешителни за използване на животни в опити с Рег. № 13 от Комисия по етика към животните при НВМС. В експериментите бяха използвани мъжки Wistar плъхове ($n = 120$; 140-250 g), отглеждани при температура 23-25°C, 12 часов цикъл на светлина/тъмнина и постоянен достъп до вода и храна.

Изследване влиянието на растителни екстракти при плъхове

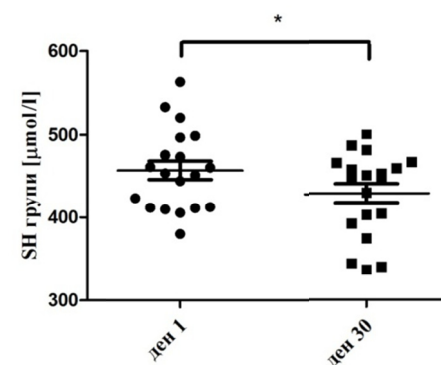
За изследване влиянието на АЕ при плъхове животните бяха разделени на групи от по 6 животни: Група СД – животни на стандартна диета, включваща 50% скорбяла, 20% протеин, 4,5% мазнини, 5% целулоза, стандартна смес от витамини и минерали. Група СД+АЕ - животни на СД, приемащи АЕ; Група Фр - животни на СД, приемащи 12,5% разтвор на фруктоза (група с фруктозоиндуцирани метаболитни нарушения); Група Фр+АЕ - животни на СД, приемащи 12,5% разтвор на фруктоза, съдържащ АЕ.

За изследване влиянието на водни извлекци от листа на *Cotinus coggygia* опитните животни бяха разделени в групи по 10 плъха: контрола (вода) (К) и три групи третирани с водни извлекци от листа (AICCL), съответно 1%, 2% и 4%. За изследване влиянието на водно-етанолови извлекци от дървесина на *C. coggygia*: контрола (вода) (К); група третирана с 20% етанол (етанолова контрола) и група, третирана с 20% водно-етанолни извлекци от дървесина. Водно-етаноловият извлек и AICCL са прилагани перорално в еднократна дневна доза 10 ml/kg чрез интрагастрална сонда в продължение на 30 дни.



Фигура 33. Стойности на ТАС на серум при здрави доброволци преди (ден 1) и след (ден 30) консумация на чай от агримония: (А) чрез използване на ABTS радикал; (Б) чрез използване на FRAP метод. Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната стойност (***) $p < 0.001$, спрямо базовите стойности измерени преди началото на изследването).

Консумацията на чай от агримония доведе до значително понижаване на количеството на тиолови групи в серума на изследваните лица в сравнение с изходните нива, измерени преди началото на интервенцията (фиг. 34).



Фигура 34. Концентрация на тиолови групи в серум на здрави доброволци преди (ден 1) и след (ден 30) консумация на чай от АЕ. Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната стойност (* $p < 0.05$, спрямо базовите стойности измерени преди началото на изследването).

здравословно състояние на доброволците е причина за това. Знае се, че растителни екстракти богати на полифеноли намаляват активността на хипоксатин/ксантин оксидазата *in vitro*. При мишки с хиперурикемия антоцианинови екстракти могат да намалят нивата на пикочна киселина (Hwa et al., 2011).

Представените резултати са първи по рода си научни данни за влиянието на чай от плодове на *S. ebulus* при хора. В подкрепа на данните за приложение на билката в народната медицина, настоящото изследване установи безспорния потенциал на растението да подобрява показателите на липидния метаболизъм. Освен това, чаят от плодове на *S. ebulus* подобрява антиоксидантния статус на организма.

Изследване на влиянието на чай от листа на Agrimonia eupatoria върху метаболитни маркери и антиоксидантния капацитет на плазма при здрави доброволци

Деветнадесет доброволци консумираха като допълнение към ежедневната си диета 200ml воден извлек от АЕ в продължение на 30 дни. Нивата на серумния ТАС значително се увеличиха след края на интервенцията ($p < 0.001$). При 68% от участниците се установи увеличаване на нивата на FRAP с 11,69% в сравнение с първия ден, като тези резултати са без статистическа значимост (Фиг. 33).

Получаване на хомогенати от тъкани

Един грам тъкан се хомогенизира в 10 ml 50mM фосфатен буфер, съдържащ 0.1 mM EDTA, за 2-3 min при 4000 rpm. Полученият хомогенат се центрофугира при 3000 rpm, 10 min, 4°C за отделяне на грубата утайка. Супернатантата е допълнително центрофугирана при 10000 rpm, 10 min, 4°C.

Определяне концентрацията на тотални тиоли

Концентрацията на тотални тиоли в серум и хомогенат от адипозна тъкан е определена по адаптиран спектрофотометричен метод, основаващ се на способността на реактива на Ellman да взаимодейства с тиолатния анион. Като стандарт е използван разтвор на редуциран глутатион.

Определяне концентрацията на малонов диалдехид – спектрофотометрично по Porter et al. (1976).

Определяне концентрацията на проинфламаторни маркери

IL-6, TNF α и CRP са определяни с търговски китове на IBL International и Helica Biosystems INC.

12. Изследване влиянието на билкови чайове върху здрави доброволци

Процедурата за провеждане на интервенциите при здрави доброволци е в съгласие с международните нормативи и е одобрена от Комисията по етика на научните изследвания при МУ – Варна. Изследванията са проведени с подкрепата на Фонд „Научни изследвания”, COST Action BM0602 и Фонд „Медицинска наука” при МУ – Варна.

Участници в изследванията

Всеки един от участниците в изследването попълва карта за информирано съгласие и анкета. Изследването с чай от АЕ включва 19 здрави доброволци на възраст 20-55 години, при съотношение жени:мъже 5:14. В изследването на ефекта на чай от бъзак бяха включени 22 здрави доброволци, сред които 16 жени и 6 мъже на възраст между 20 и 59 години. Всеки ден в продължение на 30 дни участниците пиеха чай от *A. eupatoria/S. ebulus*, като добавка към ежедневната им диета.

Дизайн на изследването

Всеки участник консумира 200ml чай в 9 ч. сутринта и 200ml в 14 ч. следобяд в продължение на 30 дни. Тоталният антиоксидантен капацитет (ТАС) и полифенолното съдържание на билковите извлекци са определяни непосредствено преди изследването. На участниците е препоръчано да не променят своите хранителни навици и начин на живот. В ден 1 и ден 30 сутрин на гладно се взема венозна кръв за анализ. Серум и плазма са отделяни и веднага след това част от серумите са замразявани на аликвоти при -80°C , а друга част е използвана за биохимични изследвания.

Антропометрични изследвания

Измервани са ръст, тегло, талия, ханш, двукратно е измервано артериално налягане, изчислен е индекс на телесна маса (kg/m^2) (ИТМ) и съотношение талия/ханш.

Метаболитни маркери

Количественото определяне на глюкоза, ТАГ, общ и HDL холестерол е осъществено чрез ензимни колометрични тестове с търговски китове на Human Gesellschaft fur Biochemica and Diagnostica, Wiesbaden, Germany. LDL холестеролът е изчислен по формулата на Friedewald (Friedewald et al., 1972). Аланин аминотрансфераза (АлАТ) и аспартат аминотрансфераза (АсАТ), както и на γ -глутамил трансфераза (γ -ГТ) са измервани в плазма с помощта на търговски китове (производител съответно Quimica Clinica Aplicada S.A., Amposta, Spain и Human, Wiesbaden, Germany).

Маркери за обща антиоксидантна активност

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

Потенциалът на плазмата да редуцира Fe^{3+} (FRAP) е измерен спектрофотометрично чрез метода на (Benzie & Strain, 1999).

богат източник на полифеноли и специално на антоцианини (Kiselova et al., 2005, 2006; Tasinov et al., 2012). Настоящото изследване разкри за първи път хиполипидемичната активност на чая от плодовете на *S. ebulus*, който доведе до значимо понижение в нивата на серумните триглицериди, общ и LDL холестерол, които в същото време останаха в референтни граници. Ниските нива на HDL холестерол се приемат като независим показател за повишен риск за развитие на сърдечносъдови заболявания (Watson, 2008). Като резултат от настоящата интервенция, бе установено, че нивата на HDL холестерола се увеличават, но без статистическа значимост. Според някои изследвания инхибирането на холестерол-естер пренасящия белтък (ХЕПБ) е възможен механизъм за увеличаване нивата на HDL холестерола и намаляването на LDL холестерола при третиране с антоцианини (Inazu et al., 1990). Антоцианините могат да намалят количеството и активността на ХЕПБ в плазма на пациенти с дислипидемия (Qin et al., 2009). Дори и при строго контролирани нива на LDL холестерола със статини, има вероятност триглицеридите и HDL холестерола да не се повлияят от терапията и рискът от ССЗ да остане висок (Cziraky et al., 2008). Следователно е желателно подобряване на всички показатели на липидния профил. Друг показател за риска от развитието на ССЗ е ниското съотношение HDL/LDL холестерол (Miller et al., 1981; Willet & Sacks, 1991). В края на настоящото изследване това съотношение се увеличи значително което предполага вероятно кардио-протективен потенциал на плодовете от бъзак. Подобно действие е докладвано за изолирани антоцианини при експериментални животни (Kwon et al., 2007; Basuny et al., 2012).

Корелация е намерена между нивата на пикочна киселина и ССЗ и други заболявания, като затлъстяване, метаболитен синдром и диабет тип 2 (Bonora et al. 1996; Costa et al., 2002; Ishizaka, et al., 2005; Kutzing & Firestein, 2008). При нашето изследване не бяха установени изменения в нивата на пикочна киселина. Вероятно доброто

(Maxwell et al., 1997). Настоящото изследване не установи значими промени в нивата на пикочна киселина, което дава основание да се приеме, че повишеният серумен ТАС по-скоро се дължи на антиоксидантното действие на полифенолите и най-вече на антоцианините в чая от плодове на *S. ebulus*.

Като резултат от консумацията на чай от бязак в края на изследването се установи значително понижение в нивата на триглицериди ($p < 0,01$), общ холестерол ($p < 0,001$) и LDL холестерол ($p < 0,001$) (фиг. 101-103). Докато нивата на HDL холестерола не се промениха съществено ($p = 0,2263$) (фиг.104), то съотношението HDL/LDL се увеличи значително ($p < 0,01$). Затлъстяването е здравен проблем в световен мащаб. Дислипидемията, като състояние съпътстващо затлъстяването се определя като един от основните рискови фактори за редица хронични заболявания. Тя се характеризира с увеличени нива на триглицериди, нормален или увеличен LDL холестерол, увеличен общ холестерол и/или намален HDL холестерол (Peterson & McBride, 2012). Нарушенията в липидния профил е една от основните причини за развитието на сърдечно съдови заболявания (Watson, 2008). Антоцианините и богатите на тях храни могат да подобрят показателите на липидния профил, с което се посочват като антиобезитни и антиатерогенни (Titta et al., 2010; Qin et al., 2009; Basuny et al., 2012). Доказано е, че екстракти богати на антоцианини водят до намаляване на триглицеридите, общият и LDL холестерол и до увеличаване на HDL холестерола при хора и гризачи (Qin et al., 2009; Hansen et al., 2005; Broncel et al., 2010; Basuny et al., 2012). Възможен механизъм за анти-хиперхолестеролемичната активност на антоцианините е способността им да стимулират отделянето на кисели и неутрални стероли с фекалиите (Liang et al., 2012). Полифенолите и богатите на тях екстракти имат потенциал да подобряват липидния профил (Yugarani et al., 1992; Al-Assaf et al. 2007; Vornhoeft et al., 2012; Basu et al., 2010). Както вече бе споменато плодовете на бязак са много

Определянен на количеството на GSH в лизати от еритроцити

Определянето на концентрацията на GSH се извършва с реактива на Ellman спектрофотометрично при 412 nm (Reiner et al., 2002).

Провъзпалителни цитокини

C-реактивен протеин е определян с търговски ELISA кит на DIAsource Immunoassay SA, Nivelles, Belgium; нивата на TNF- α и IL6 – с търговски ELISA кит на Gen-Probe Diacclone SAS, Besancon Cedex, France.

Адипокини

Серумните нива на лептин и адипонектин са определени с търговски ELISA китове на DIAsource Immunoassay SA, Nivelles, Belgium.

13. Определяне нивото на гена експресия

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

Изолиране на РНК

Изолиране на РНК от клетки в култура

Изолирането на РНК от клетки е извършено с помощта на TriReagent (Ambion, USA), като лабораторният протокол следваше указанията на производителя. Количеството на нуклеиновата киселина бе оценявано спектрофотометрично (спектрофотометър M501 Single Beam UV/Vis, CamSpec, UK).

Изолиране на РНК от адипозна тъкан

Изолирането на РНК от адипозна тъкан е извършвано с помощта на TriReagent. Двадесет милиграма предварително замразена тъкан се стриват в 1,5 ml стерилна епруветка с помощта на стерилна стъклена пръчица и към получения хомогенат се добавят 500 μ l TriReagent. По-нататък процедурата следваше инструкциите на производителя.

Изолитране на РНК от мононуклеарни клетки от периферна кръв (Buffy coat)

Хепаринизирана цяла кръв се центрофугира за 15min при 4000rpm, полученият междинен слой (Buffy coat) се отнема и използва за последващо изолитране на РНК с помощта на TriReagent.

Обратна транскрипция – RT-PCR

РНК (0,1-5 µg) бе обратно транскрибирана с помощта на Revertaid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Germany), съдържащ олиго (dT)18 праймер и RevertAid™ обратна транскриптаза.

Количествен Real Time PCR

Амплификацията на кДНК в реално време е извършена с ген-специфични праймери. За конструирането им и на ФБП е използван Real-Time PCR gene expression Design Tool; синтезирани от Sigma-Aldrich и Integrated DNA Technologies. Като матрица е използвана 0,01-0,1µg кДНК; крайна концентрация на праймерите - 300nM, а на ФБП (5'FAM-3'Tamra) – 100nM. Анализът на експресията на GPx4 и IL-6 е извършен с помощта на Green Master Mix, съдържащ флуоресцентното багрило Eva Green (Genaxxon, Germany), а анализът на GCL и MCP-1 - с Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (Fermentas, Germany), на ABI Prism 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Краен обем на реакционната смес - 5 µl; 40 цикъла: активиране на ензима и денатурация - 95°C/10 min; амплификация - 95°C/15 sec, анилинг - 60°C/1 min. Анализът е извършен на ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). Стойностите на генната експресия са изчислени по ΔΔCt метода (Livak and Schmittgen, 2001) и са изразени в относителни единици, в сравнение с нетретирания контрола, при която нивото на експресия на анализирания ген се приема за единица. Резултатите са представени като средна стойност на относителните единици±стандартна грешка. Като ендогенна контрола, спрямо която се нормализират стойностите, е използван β-актин. Всички измервания са извършвани в три повторения. PCR

2013). Екстракт от плодове богати на антоцианини увеличават ТАС на плазма с 20-25% както при здрави, така и при оксидативно стимулирани експериментални животни (Lionetto et al., 2011). Ефектът на чая от плодове на *S. ebulus* върху ТАС на серум може да се дължи на добрата бионаличност на антоцианините. За разлика от много полифеноли, те могат да бъдат абсорбирани както в гликозилирана, така и в ацетилираната им форма при хора (Manach et al., 2004; Mazza et al., 2002). Доказана е корелацията между нива на антоцианини и ТАС в серум (Mazza et al., 2002). Доказаното повишение на серумния ТАС в настоящото изследване, най-вероятно се дължи на съдържащите се в чая от плодове на *S. ebulus* антоцианини.

Освен ТАС на серум бяха измерени нивата също и на тотални тиоли и пикочна киселина в серум и на GSH в лизати от еритроцити. Изборът на допълнителни маркери за проследяване на антиоксидантната активност - плазмени (ТТ и пикочна киселина) и вътреклетъчен (GSH) в допълнение на анализа на общия антиоксидантен капацитет, бе от значение за по-пълна информативност на резултатите за антиоксидантния статус на организма. Концентрацията на серумните тотални тиоли определена на грам белтък бе увеличена значително в края на настоящото изследване. Подобно повишение в серумните ТТ се установява и при болни от диабет тип 2 консумирали екстракти от плодове богати на антоцианини extract (Bonina et al., 2002; Rosenblat et al., 2006). Известно е, че полифенолите и антоцианините са с висока АOA (Kurin et al., 2012; Bräunlich et al., 2013), а антоцианините се абсорбират относително добре, което дава основание да се предположи, че увеличените нива на серумни ТТ вероятно се дължат на антиоксидантното действие на биологично активните съединения в чая. Глутатионът в плазма, наред с други плазмени тиолови белтъци, се очаква да има съществен дял в неутрализирането на *in vitro* генерирания ABTS⁺ катион радикал при анализа на ТАС. Пикочната киселина е един от основните компоненти, характеризиращи ТАС на серум

контрол и очаквано при здрави доброволци в настоящото проучване те останаха в референтни граници с лека тенденция за понижение в края на интервенцията.

Биологичната активност на чая от плодове на *S. ebulus*, може би се дължи на съдържащите се в него биологично активни вещества. Изследванията на чая показаха висока *in vitro* АОА, съдържание на полифеноли и антоцианини. Антиоксидантна активност на чая от плодове на *S. ebulus* използван в изследването съответстваше на 7,23 mmol/L UAE. Съдържанието на тотални полифеноли и антоцианини в чая, както и дневният прием, са представени в таблица 33. Бе изчислено, че антоцианините представляват около 8% от общото съдържание на полифеноли в чая. В предходни изследвания бе доказано, че водни и водно-метанолни екстракти от плодове на растението проявяват висока АОА и съдържание на тотални полифеноли, в сравнение с други антоцианини съдържащи плодове (Kiselova et al., 2005). Изследвания на други колективи посочват, че плодовете от бязак са богати на фенолни киселини, такива като кафеена киселина и нейни производни (хлорогенна и кумарова киселини) (Ebrahimzadeh et al., 2008, 2010; Shokrzadeh & Saravi, 2009). Водно и водно алкохолните екстракти от плодове на бязак са богати на антоцианини (Ivanova et al., 2009, Shokrzadeh et al., 2009; Tasinov et al., 2012). В предишно наше изследване бе потвърдена високата АОА на екстракта от плодовете на бязак, която корелира със съдържанието на тотални полифеноли и антоцианини (Tasinov et al., 2012).

В настоящото проучване като основен показател за антиоксидантната активност на чая от *S. ebulus* беше измерен общият антиоксидантен капацитет на серума (ТАС). След 30 дневна консумация на чай от плодове на бязак ТАС на серума на изследваните лица бе значително увеличен. Подобен ефект е установен и при хора, и при плъхове, подложени на диета, включваща други видове богат на полифеноли/ антоцианини чай (Cao et al., 1998; Tsuda et al., 1998; Mertens-Talcott et al., 2008; Ivanova et al.,

ампликоните при Eva Green - базирания анализ бяха проверени за наличие на неспецифична амплификация чрез построяване на денатурационна крива.

14. Статистически анализ

Там, където не е уточнено допълнително, стойностите са представени като средна стойност±стандартно отклонение на средната стойност (Mean±SD) или като средна стойност ±стандартна грешка (Mean±SEM). Използвани са ANOVA тест и чифтен t-тест на Student (95% доверителен интервал) на статистическата програма GraphPadPrism (v.5.00). За статистически достоверни бяха приети различия при ниво на значимост $p < 0.05$.

15. Използвани реактиви

Всички използвани химикали бяха с качество „за анализ“, произведени от фирмите: Merck, Fluka, Sigma-Aldrich, Applichem, Lachner, Scharlau др. Хранителни среди, разтвори на трипсин, пеницилин и стрептомицин: от Cambrex; консумативи за работа с клетъчни култури: от Greiner-bio-one; китове за синтез на кДНК и Real Time PCR: от Fermentas; Tri-Reagent: от AmBion; праймери и сонди: от Sigma-Aldrich и Integrated DNA Technologies; клетъчни култури: от ATCC.

V. Резултати и обсъждане

1. Антиоксидантна активност и съдържание на полифеноли в екстракти от български лечебни растения

Сравнителното измерване на антиоксидантната активност на водни извлеци от български лекарствени растения и четири популярни със своите антиоксидантни свойства и широко използвани за приготвянето на чай чужди растения: *Ilex paraguariensis* (мате), *Aspalathus linearis* (ройбос), *Cyclopia intermedia* (ханибуш) и *Camellia sinensis* (зелен и черен чай) позволи да бъдат идентифицирани три групи видове с различен ТЕАС - нисък (по-нисък от 1 ммол/л), междинен (от 1 ммол/л до 2 ммол/л) и висок (над 2 ммол/л).

Таблица 3. ТЕАС на водни извлеци от лекарствени растения.

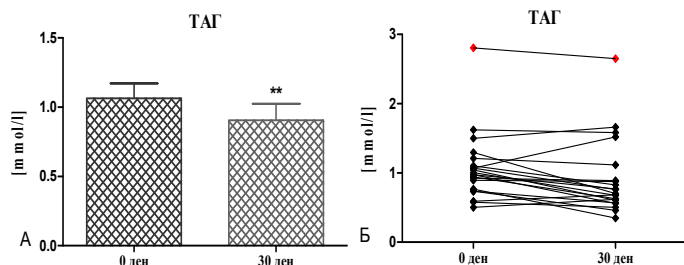
Растение	ТЕАС mean±SD [mM]	Концентрация на полифеноли mean±SD [μM]
<i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach.	0.09±0.01	40.49±0.74
<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (L.) Spreng.	0.41±0.17	82.03±1.43
<i>Cichorium intybus</i> L.	0.43±0.06	151.84±1.81
<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medik.	0.46±0.02	108.69±2.55
<i>Plantago major</i> L.	0.51±0.08	250.84±6.76
<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	0.71±0.03	155.94±2.71
<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	0.72±0.07	279.93±4.72
<i>Verbena officinalis</i> L.	0.75±0.03	249.67±3.27
<i>Sideritis scardica</i> Griseb.	0.86±0.05	235.80±3.76
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	0.86±0.11	254.35±4.06
<i>Taraxacum officinale complex</i>	1.02±0.14	362.14±6.76
<i>Humulus lupulus</i> L.	1.04±0.10	299.46±5.04
<i>Mentha piperita</i> L.	1.27±0.14	310.78±2.35
<i>Tilia platyphyllos</i> Scop.	1.27±0.08	185.23±1.88
<i>Cyclopia intermedia</i> E. Mey.	1.46±0.13	384.79±4.28
<i>Aspalathus linearis</i> (N.L. Burm.) R. Dahlgr.	1.62±0.02	437.90±1.11
<i>Pulmonaria officinalis</i> L. *	2.02±0.14	673.39±9.92
<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil. *	3.50±0.29	651.91±4.28
<i>Hypericum perforatum</i> L. *	3.75±0.14	881.93±6.68

Обсъждане

Някои научни изследвания посочват, че антоцианинови екстракти могат да доведат до намаляване на телесната маса и обема на мастната тъкан при плъхове подложени на богата-липидна и богата-фруктозна диета (Tsuda et al., 2003; Kwon et al., 2007; Titta et al., 2010; Bratoeva et al., 2010). В настоящето изследване 30 дневна консумация на чая от плодове на *S. ebulus* не доведе до значимо намаление на теглото и ИТМ при здрави доброволци, както и на съотношението талия/ханш. Краткият период от 30 дни, както и фактът, че настоящето изследване включваше здрави доброволци с нормално тегло и ИТМ, са вероятни причини за липсата на значима промяна в тези параметри. Наблюдаваната липса на ефект по отношение на ИТМ е в подкрепа на резултатите получени от други изследвания с участие на хора, при които при хора суплементиране с антоцианини или консумация на сок от боровинки, богат на антоцианини, флавоноли, фенолни киселини и др. също не повлияват статистически значимо ИТМ (Qin et al., 2009; Karlsen et al., 2010). В края на изследването бе установена лека тенденция за намаляване на диастоличното кръвно налягане. Този резултат е в подкрепа на данните от други изследвания проучващи влиянието на антоцианините върху кръвното налягане (Burns et al., 2000; Qin et al., 2009; Broncel et al., 2010). Богати на антоцианини екстракти могат да индуцират вазодилатация, вероятно чрез увеличаване на продукцията и освобождаването на NO (Stoclet et al., 1999; Nakamura et al., 2002; Zenebe et al., 2003).

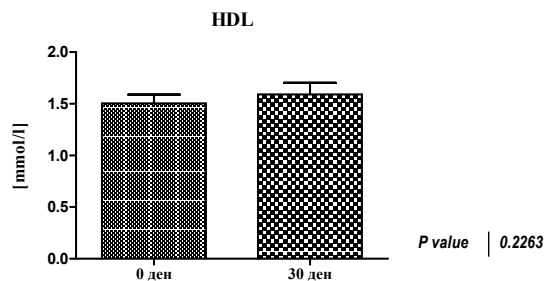
Нивата на кръвна захар се запазиха в референтните граници и в края на изследването. Въпреки това, има проучвания, които съобщават, че антоцианините проявяват хипогликемична активност при плъхове, подложени на богато-липидна и богато-фруктозна диета (Grace et al., 2009; Takikawa et al., 2010). Други изследвания при хора сочат, че богати на полифеноли екстракти не повлияват кръвната захар при здрави доброволци (Ivanova et al., 2013). Нормално нивата на кръвна захар са под строг хормонален

Подобен ефект в действието на инфузията бе отчетен и при измерването на ТАГ в серум на здрави доброволци (фиг. 31). Разликата в средните стойности на показателя измерени в ден 0 и ден 30 е с висока статистическа значимост ($p < 0.01$).



Фигура 31. Изменение в стойностите на ТАГ в серум от здрави доброволци в преди (0 ден) и след (30 ден) консумация на чай от плодове на бязак. А. Изменение в средните стойности за групата; Б. Изменение в индивидуалните стойности на участниците. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната стойност (** $p < 0.01$)

Беше проследен и ефектът на чай от бязак върху нивата на HDL-холестерола. Наблюдава се леко повишаване на средната стойност за ден 30 в сравнение с измерените изходни нива (фиг. 32).



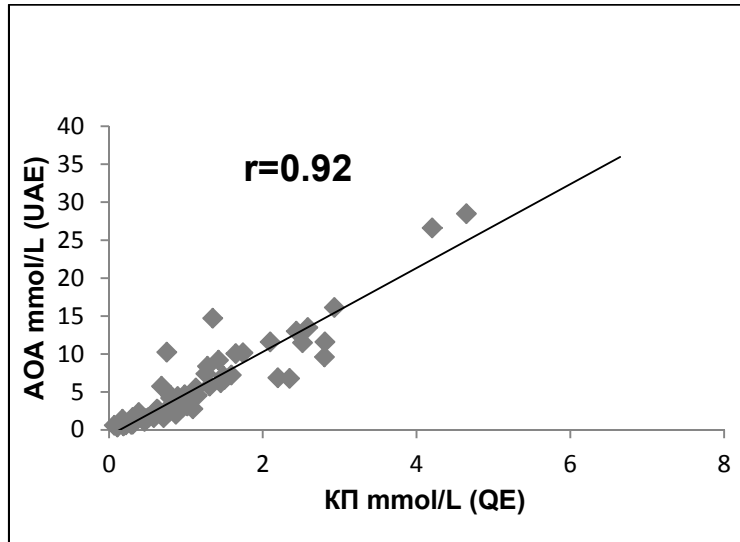
Фигура 32. Изменение в стойностите на HDL-холестерол в серум от здрави доброволци преди (0 ден) и след (30 ден) консумация на чай от плодове на бязак.

<i>Agrimonia eupatoria</i> L. *	3.76 \pm 0.05	702.29 \pm 6.82
<i>Camellia sinensis</i> Kuntze * (черен чай)	3.92\pm0.14	187.96\pm2.25
<i>Melissa officinalis</i> L. *	4.06 \pm 0.31	1370.09 \pm 41.38
<i>Rubus sp. diversa</i> *	4.23 \pm 0.12	608.95 \pm 5.95
<i>Origanum vulgare</i> L. *	5.87 \pm 0.20	1653.61 \pm 11.52
<i>Camellia sinensis</i> Kuntze * (зелен чай)	5.91\pm0.14	317.62\pm3.76
<i>Cotinus coggygria</i> Scop. *	7.05 \pm 0.19	923.33 \pm 14.19

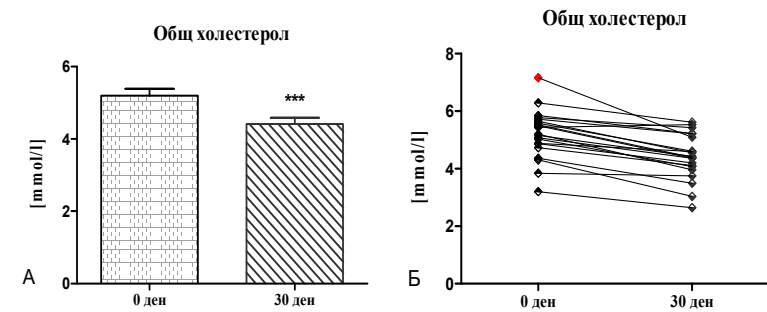
Получените резултати позволяват да се направи заключението, че сред изследваните български растения има такива, които са сравними, а дори и по-добри като източници на водоразтворими антиоксиданти от проучените в сравнение четири растения с чужд произход. При използването на TEAC метода е отдиференцирана група български растения с много високи стойности по сравнение с ханибуш, ройбос, мате, зелен и черен чай. Големи разлики в съдържанието на полифеноли не винаги съответстват на толкова големи разлики в TEAC стойностите, но седем билки са едновременно с високо съдържание на полифеноли и висока антиоксидантна активност на водните инфузии: *Pulmonaria officinalis* (TEAC 2.02 \pm 0.14 mM/ QE 673.39 \pm 9.92 μ M), *Hypericum perforatum* (TEAC 3.75 \pm 0.14 mM/ QE 881.93 \pm 6.68 μ M), *Agrimonia eupatoria* (TEAC 3.76 \pm 0.5 mM/ QE 702.29 \pm 6.82 μ M), *Origanum vulgare* (TEAC 5.87 \pm 0.2 mM/ QE 1653.61 \pm 11.52 μ M), *Melissa officinalis* (TEAC 4.06 \pm 0.31 mM/ QE 1370.09 \pm 41.38 μ M), *Rubus sp. diversa* (TEAC 4.23 \pm 0.12 mM/ QE 608.95 \pm 5.95 μ M), *Cotinus coggygria* (TEAC 7.05 \pm 0.19 mM/ QE 923.33 \pm 14.19 μ M).

При определяне на антиоксидантната активност (АОА) и концентрацията на полифеноли (КП) във водно-алкохолни

екстракти беше установена много висока корелативна зависимост: $r=0,92$ (фиг. 2) при 40% водно-етанолови екстракти и $r = 0,93$ за водно-метанолови екстракти (фиг. 3). Най-високо съдържание на полифеноли беше измерено в етаноловите екстракти от *Cotinus coggygria* ($4,65\pm 0,08$ mM) и *Arctostaphylos uva-ursi* ($4,20\pm 0,03$ mM), като съдържанието на полифеноли в тях е близо 2 пъти по-високо от това на референтните растения ройбос ($2,35\pm 0,03$ mM) и мате ($2,20\pm 0,07$ mM). Други шест вида също показаха съдържание на полифеноли в техните екстракти по-високо от това на ройбос и мате. Това са *Fragaria vesca* ($2,93\pm 0,06$ mM), *Origanum vulgare* ($2,81\pm 0,06$ mM), *Melissa officinalis* ($2,80\pm 0,03$ mM), *Hypericum perforatum* ($2,56\pm 0,02$ mM), *Rheum officinale* ($2,52\pm 0,10$ mM), *Cydonia vulgaris* ($2,44\pm 0,04$ mM). В екстракти от още осем вида бяха установени концентрации на полифеноли по-високи от тази в екстракта от черен чай.

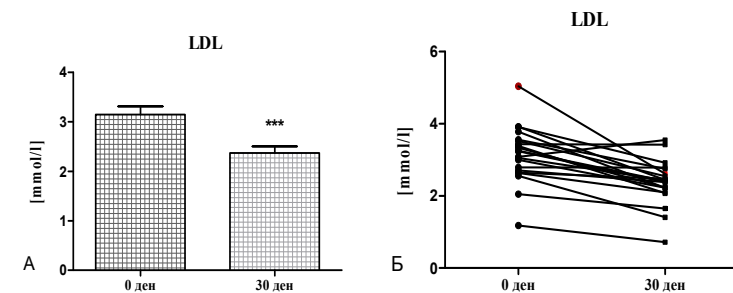


Фигура 2. Корелация между антиоксидантна активност и концентрация на полифеноли на 40% водно-етанолови екстракти



Фигура 29. Изменение в стойностите на общ холестерол в серум на здрави доброволци преди (0 ден) и след (30 ден) консумация на чай от плодове на бъзак. А. Изменение в средните стойности за групата; Б. Изменение в индивидуалните стойности на участниците. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната стойност (***) $p < 0.001$

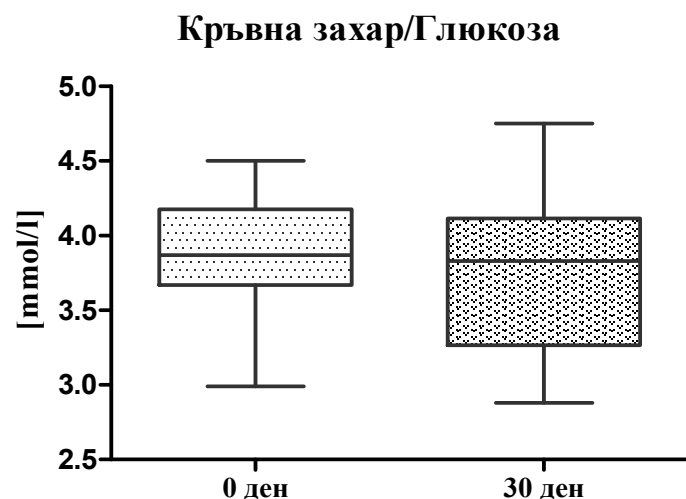
Наред с понижаване на общия холестерол, беше отчетено значително понижаване на концентрацията и на LDL-холестерола в серум (фиг. 30).



Фигура 30. Изменение в стойностите на LDL-холестерол в серум от здрави доброволци преди (0 ден) и след (30 ден) консумация на чай от плодове на бъзак. А. Изменение в средните стойности за групата; Б. Изменение в индивидуалните стойности на участниците. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната стойност (***) $p < 0.001$

Изследване ефекта на воден екстракт от плодове на *Sambucus ebulus* върху нивата на кръвна захар и липидния профил при здрави доброволци

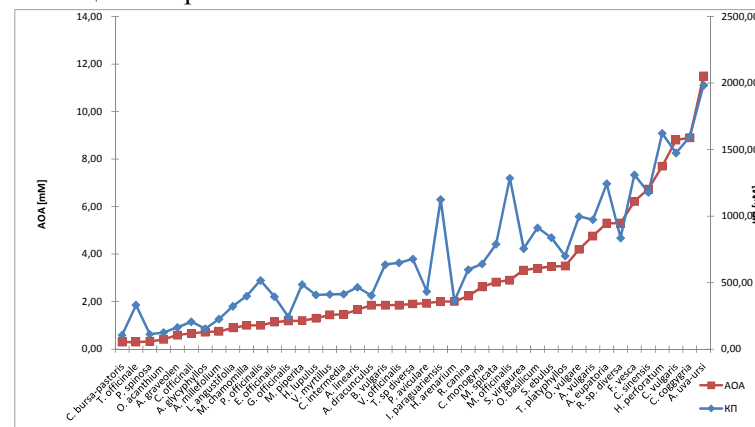
Средната стойност на кръвната захар в началото на изследването бе 3.91 mmol/l. След периода на суплементиране с чай от плодове на бязак беше определена средна стойност на кръвната захар за цялата група участници от 3.75 mmol/l (фиг. 28).



Фигура 28. Изменение в стойностите на кръвна захар при здрави доброволци преди (0 ден) и след (30 ден) консумация на чай от плодове на бязак. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната стойност ($p=0.142$)

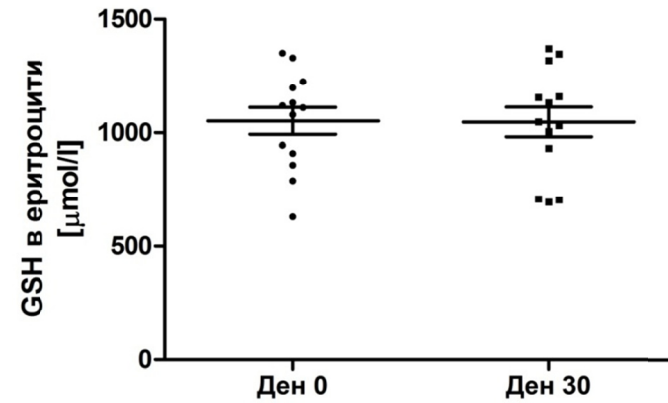
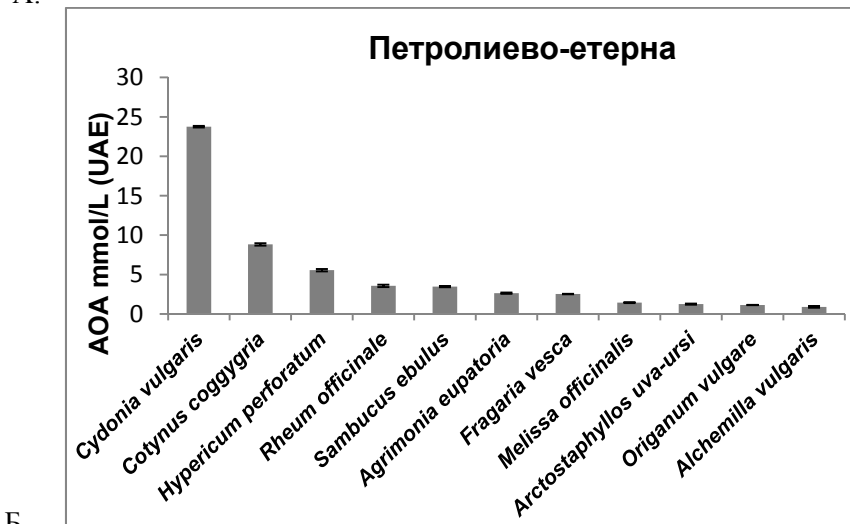
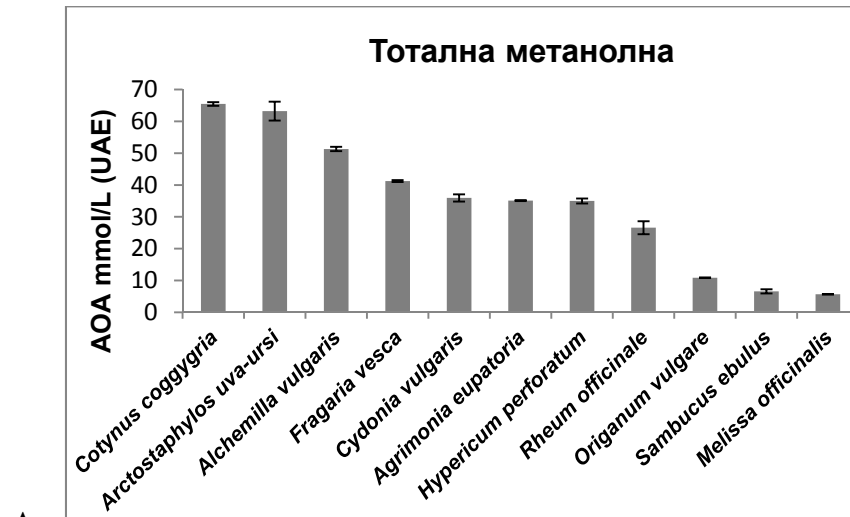
Консумацията на чай от бязак доведе до значително понижаване концентрацията на общия холестерол в серума на изследваните лица (фиг. 29). Разликите в средните стойности на групата преди и след периода на консумация на чая са с голяма статистическа достоверност ($p<0.001$).

Определената висока степен на позитивна корелация между съдържанието на полифеноли и тоталния антиоксидантен капацитет във водно-алкохолните екстракти очертава ролята на полифенолите за антиоксидантния потенциал на растенията.

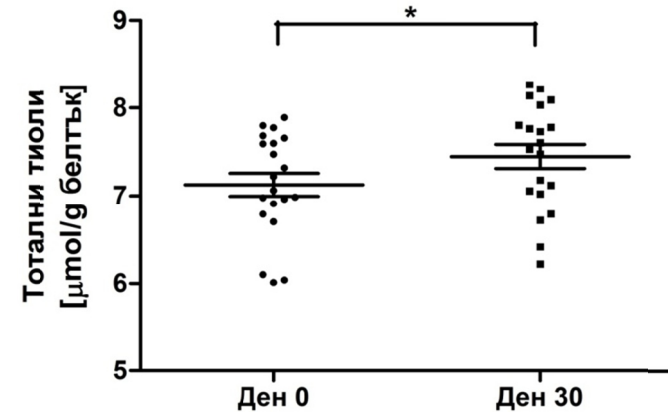


Фигура 3. Антиоксидантна активност и съдържание на полифеноли във водно-метанолови екстракти ($r = 0,93$).

Въз основа на резултатите от измерването на АОА и КП бяха подбрани единадесет вида български лечебни растения, които да бъдат подложени на фракционен анализ. Резултатите от измерването на АОА и КП в тотален метанолен екстракт (ТМЕ), хлороформна (ХФ), бутанолна (БФ), петролиево-етерна (ПЕФ), етилацетатна (ЕАФ) и водна (ВФ) фракции са представени на фиг. 4.



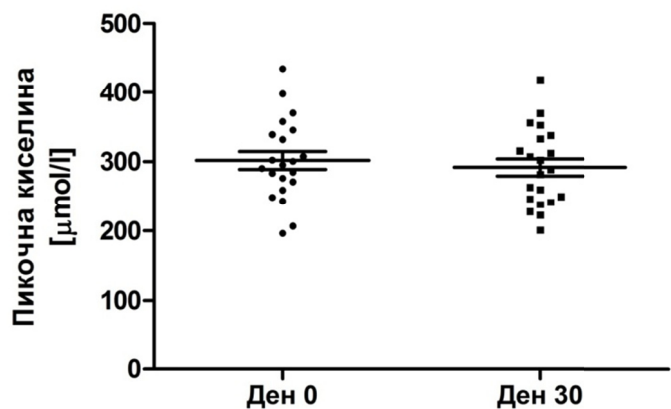
Фигура 26. Концентрация на глутатион в еритроцити на здрави доброволци преди (ден 0) и след (ден 30) консумация на чай от бязак. Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната стойност.



Фигура 27. Концентрация на тотални тиоли в серум на здрави доброволци преди (ден 0) и след (ден 30) консумация на чай от плодове на *S. Ebulus*. Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната стойност. (*p<0.05).

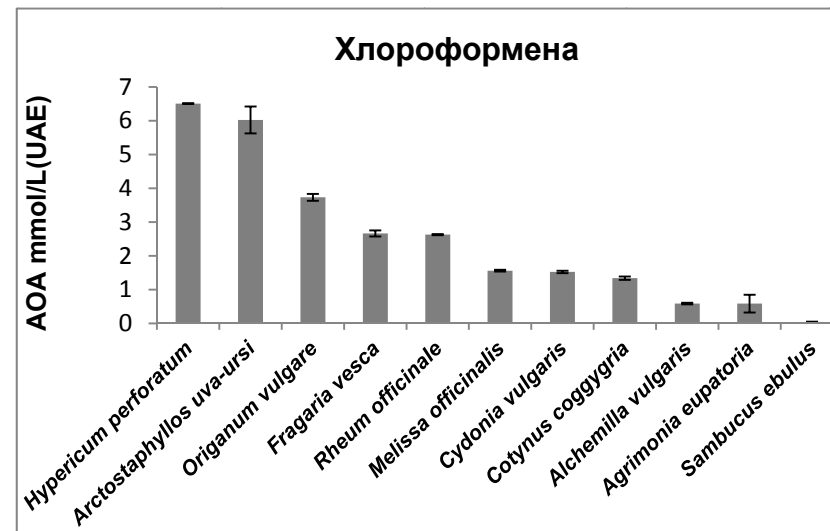
След 30 дневна консумация на чай от бязак бе установено значително повишаване на серумния ТАС спрямо нулевия ден, като отчетените разлики показаха висока статистическа достоверност ($p < 0.001$) (фиг. 24).

В изследването не бяха отчетени статистически значими изменения в стойностите както на пикочната киселина в серума на изследваните лица, така и на GSH в лизати от еритроцити след 30 дневна консумация на чай от бязак (фиг. 25-26). Запазването на постоянни стойности на ПК в случая предполага, че АОА на екстракта е вероятната причина за увеличаване на ТАС на серума.

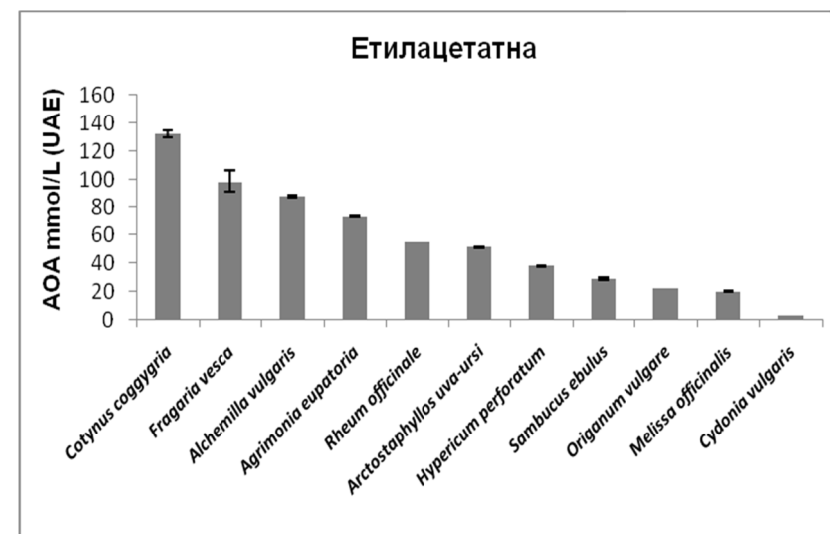


Фигура 25. Концентрация на пикочна киселина в серум на здрави доброволци преди (ден 0) и след (ден 30) консумация на чай от бязак. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната стойност

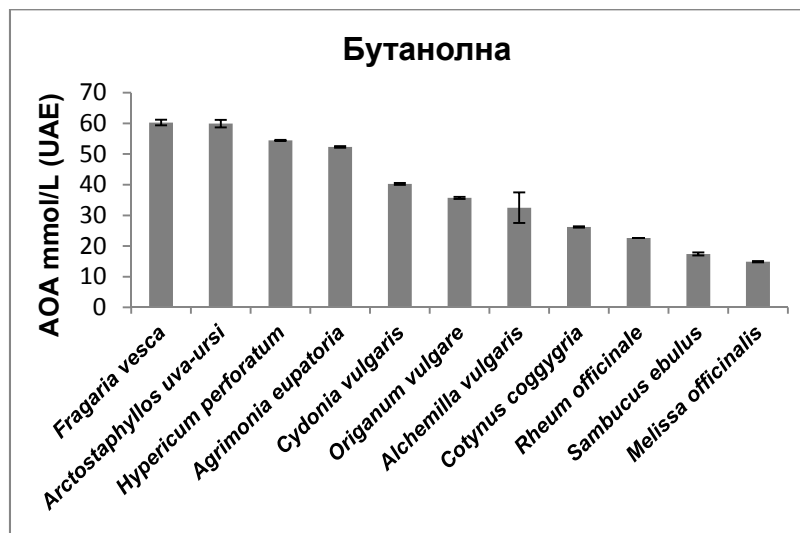
В.



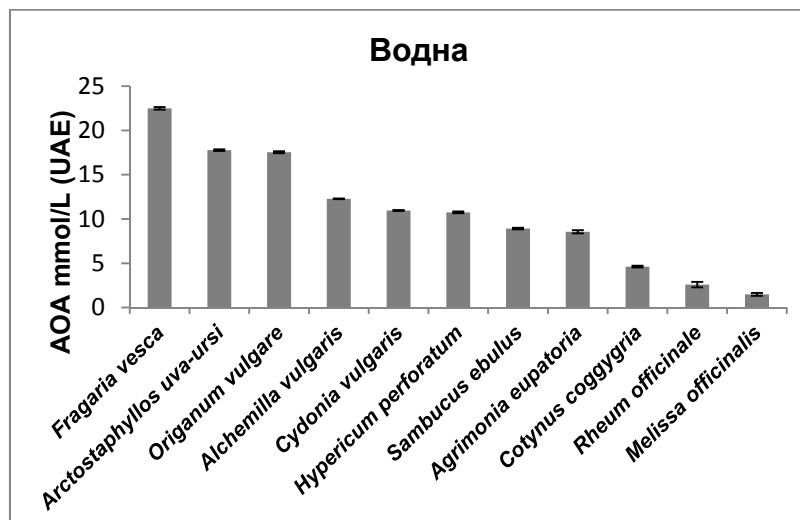
Г.



Д.



Е.



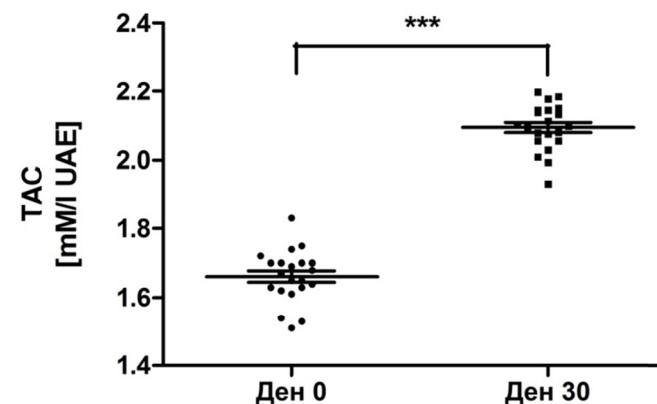
Фигура 4. Антиоксидантна активност на различни видове фракции от изследваните растения: А – тотална метанолна; Б – петролиево-етерна; В – хлороформена; Г – етилацетатна; Д – бутанолна; Е – водна.

Таблица 8. Метаболитни маркери на здрави доброволци преди и на 30 ден от консумация на чай от *Sambucus ebulus*

Параметър [mmol/l]	Ден 0	Ден 30	Изменение [%]	р ст-ст
Кръвна захар	3.89 ± 0.08	3.75 ± 0.11	3.57	0.1420
Триглицериди	1.06 ± 0.11	0.91 ± 0.12**	14.92	0.0071
Общ холестерол	5.20 ± 0.19	4.41 ± 0.17***	15.04	0.0001
HDL- холестерол	1.50 ± 0.08	1.59 ± 0.11	5.76	0.2263
LDL- холестерол	3.15 ± 0.17	2.37 ± 0.13 ***	24.67	0.0001
HDL/LDL	0.54 ± 0.06	0.77 ± 0.11**	42.77	0.0017

Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната стойност (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо базовите стойности измерени преди началото на изследването).

На фиг. 24 са представени резултатите от измерването на общия антиоксидантен капацитет (ТАС) на серуми от здрави доброволци преди и в края на периода на изследването.



Фигура 24. Стойности на ТАС на серум при здрави доброволци преди (ден 0) и след (ден 30) консумация на чай от бъзак. Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната стойност (** $p < 0.001$, спрямо базовите стойности измерени преди началото на изследването)

Таблица 6. Антропометрични измервания и демографски данни на изследваните доброволци.

	Ден 0	Ден 30	Изменение [%]
Пол (мъж/жена)	6/15		
Възраст (години)	25.19 ± 2.28		
Ръст (m)	1.68 ± 0.02		
Тегло (kg)	65.22 ± 4.13	64.68 ± 4.07	0.83
ИТМ (kg/m ²)	23.12 ± 1.31	22.93 ± 1.29	0.83
Талия/Ханш	0.78 ± 0.01	0.81 ± 0.03	3.77
Кръвно налягане - систолично (mmHg)	109.57 ± 3.99	107.86 ± 2.84	1.56
Кръвно налягане - диастолично (mmHg)	72.95 ± 2.62	69.29 ± 2.40	5.03

Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната стойност. ИТМ (индекс на телесната маса).

Таблица 7. Съдържание на тотални полифеноли и тотални антоцианини в чая от плодове на бъзак, консумиран от здрави доброволци.

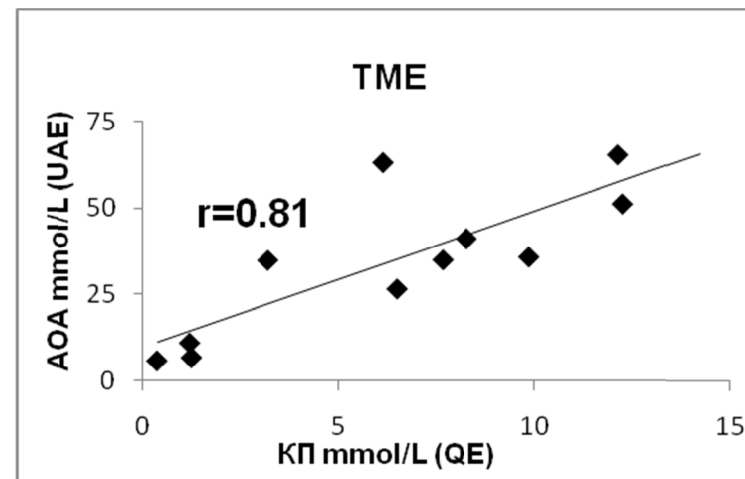
	Концентрация	Съдържание (mg/g сухо тегло)	Дневен прием (mg/200ml чай)
Тотални полифеноли	0.75±0.02 mM QE	23.57±0.6	45.32±1.15
Тотални антоцианини	18.31±0.07 mg/L CGE	1.9±0.01	3.66±0.01

Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната стойност. ИТМ (индекс на телесната маса).

Данните за кръвна захар и липиден профил на участниците в началото и в края на интервенцията са представени в таблица 8.

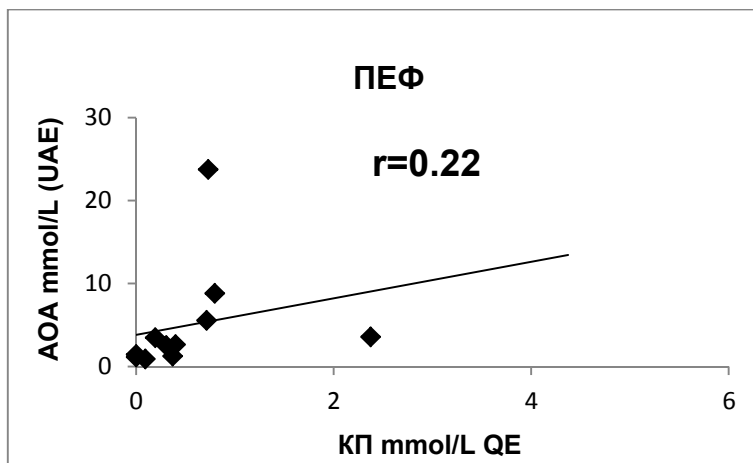
Измежду изследваните растения с най висока АОА на тоталния метанолов екстракт се отличават *Cotinus coggygria* (65,47±0,57 mM) и *Arctostaphylos uva-ursi* (63,23±2,97 mM), на петролево-етерната фракция – *Cydonia vulgaris* (23,75±0,1 mM), на хлороформената - *Hypericum perforatum* (6,51±0,01 mM) и *Arctostaphylos uva-ursi* (6,02±0,4 mM), на етилацетатната *Cotinus coggygria* (132,15±2,48 mM), на бутанолната *Fragaria vesca* (60,27±0,93 mM) и *Arctostaphylos uva-ursi* (59,91±1,23 mM) и на водната *Fragaria vesca* (22,49±0,15 mM).

Изчисляването на степента на корелация между АОА и КП показва много висока зависимост при етилацетатната (r=0,93), бутанолната (r=0,81) фракции и при тоталния метанолов екстракт (r=0,81). При останалите фракции не беше установена такава зависимост. Стойностите на r при петролево-етерната, хлороформената и водната фракции са съответно r=0,22; r=0,03, r=0,34 (фиг. 5).

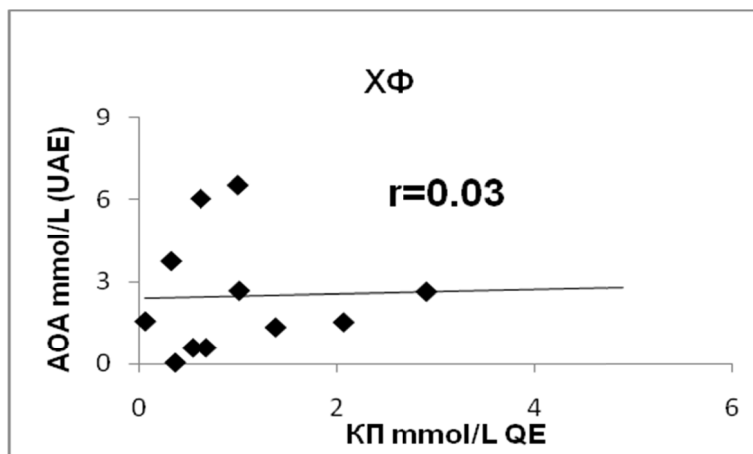


A

Б



В



предсказване на човешката фармакокинетика от *in vivo* предклинични данни. В последните години дори са въведени параметри като “Ниво без наблюдавани нежелани лекарствени реакции (NOAEL)”, определено в предклиничните изпитвания с най-чувствителния и релевантен животински модел и “Минимално очаквано ниво на биологичен ефект (MABEL)” (Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human clinical trials with investigational medicinal products. CHMP/SWP/28367/07). И макар че животинските модели са в центъра на проучвания за предсказване на лекарствения отговор при човек, те имат своите ограничения поради особеностите на метаболизма при хора и използвания животински вид, предвид генетичните вариации в човешкия геном (в т.ч. единични нуклеотидни полиморфизми, SNPs; наличие на множествени копия на един алел, CNVs); ефектите на делециите и инсерциите на генетичния материал), както и от гледна точка на епигенетичните промени в хода на онтогенезата. Това налага изследване на антиоксидантното действие и биологични ефекти на избрани български лекарствени растения при здрави доброволци.

Изследване на влиянието на чай от плодове на Sambucus ebulus върху някои антропометрични показатели, метаболитни маркери и антиоксидантния капацитет на плазма при здрави доброволци

Антропометричните и демографски данни за участниците – 22 здрави доброволци на възраст между 20 и 59 години са представени в таблица 6. Всички доброволци в продължение на 30 дни консумираха като допълнение към ежедневната си диета 200ml воден извлек от плодове на бязак, съставът на полифеноли и антоцианини в който бе предварително определен (таблица 7).

пикочната киселина за група 2 изключва възможността да има разпад на ДНК, което е в потвърждение на липсата на токсичност. AICCL имаше и благоприятен ефект върху серумния редокс статус, оценен на базата на измерените пониски стойности на MDA в група 2. По-ниските нива на липидната пероксидация могат да бъдат отнесени към редуциращите свойства на полифенолите ($p < 0.05$ за 1% AICCL - група и тенденция за намаляване и при другите две третирани групи).

Изследванията върху органични хомогенати ни позволяват да приемем, че инфузията от листа на смрадлика не променя редокс статуса на бъбреците или мозъка, тъй като като MDA, пикочната киселина и SH групите не се промениха съществено при третирането. Високите чернодробни нива на пикочната киселина могат да бъдат свързани с интензивния метаболизъм на полифеноли, извършван предимно там. Полифенолите, за които е известно, че индуцират експресията на много гени от различни сигнални пътища, биха могли да допринесат до нарастването на РНК в хепатоцити, а активираният нуклеотиден метаболизъм и последващото го усилено разграждане на нуклеотиди да е свързан с по-високите нива пикочната киселина.

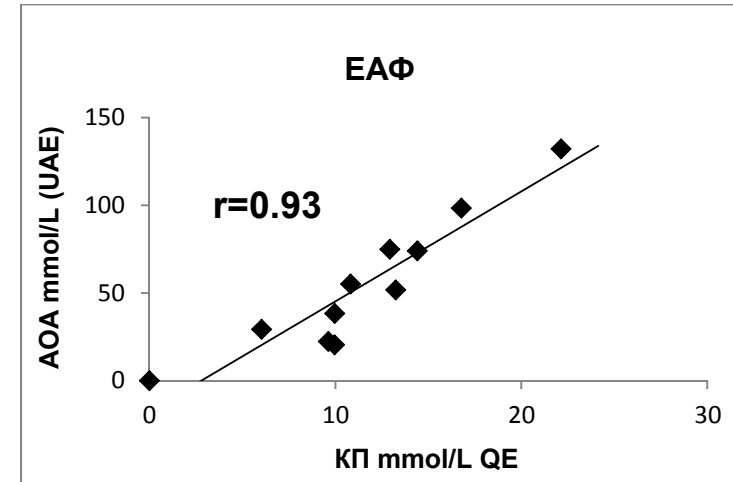
Субхроничното приложение на воден извлек от листата на *S. coggygia* е нетоксично в прилаганите концентрации и това обяснява до известна степен защо, въпреки че е считана за отровно растение, смрадликата намира приложение в балканската народна медицина.

Понижаването на серумните триглицериди е благоприятен ефект на растението върху липидния метаболизъм, съобщаван за първи път.

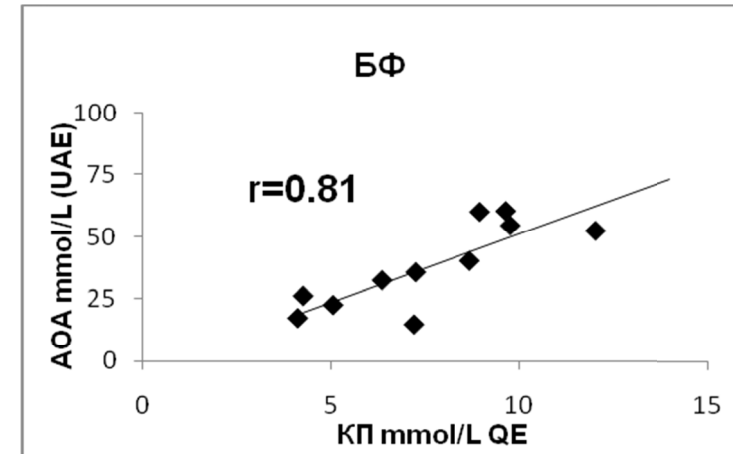
4. Изследване на биологичното действие на избрани български лекарствени растения при здрави доброволци

Съществуват различни методи за екстраполиране данните от *in vivo* животински модели при човек, като алометричният подход е най-добре описаната техника за

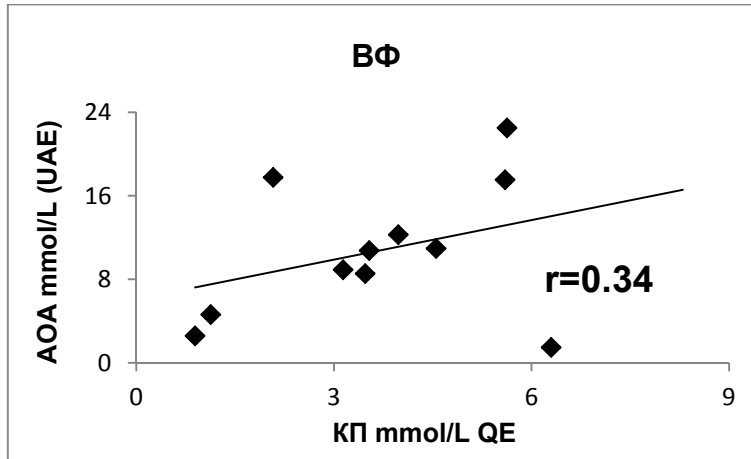
Г



Д



E



Фигура 5. Степен на корелация между антиоксидантна активност и концентрация на полифеноли в различните видове фракции на изследваните растения: А – тотална метанолна (ТМЕ); Б – петролиево-етерна (ПЕФ); В – хлороформена (ХФ); Г – етилацетатна (ЕАФ); Д – бутанолна (БФ); Е – водна (ВФ).

Обсъждане

Прилагането на фракционен анализ при изследване на растителни екстракти позволява по-детайлно проучане на фитохимичния състав на растителния материал. Измерването на АОА на различните видове фракции показва в кои от тях се извличат най-много от веществата с антиоксидантна природа. Същевременно, видът на съответните вещества, който обуславя различна разтворимост в съответните видове фракции, позволи растенията да бъдат групирани в зависимост от съдържанието на антиоксиданти и ПФ.

Сравнението на показателите при шестте вида фракции показва, че като цяло с най-висока АОА и концентрация на полифеноли се откроява етилацетатната фракция, последвана от бутанолната и тоталната метанолна, докато

Интересен резултат бе установено значително намаляване на ТАГ в серума на групата, третирана с 20% ЕСССВ ($p < 0,05$ спрямо етаноловата контрола) - ЕСССВ инфузия нормализира повишените от етанола нива на триглицеридите в третираната група, оказвайки потенциален благоприятен ефект върху липидния метаболизъм.

Таблица 5. Резултати от биохимичните анализи на серум от експериментални животни, третиран с водни извлеци от листа от *C. coggygia*

Биохимични показатели	Контрола	1% АССС	2% АССС	4% АССС
AST [U/L]	120.2±13.21	128.9±15.37	115.5±8.11	129.1±11.42
ALT [U/L]	31.33±2.84	30.12±2.10	34.66±2.53	33.33±3.14
ALP [U/L]	408.0±53.43	416.4±28.45	390.3±48.32	338.6±17.28
Креатинин [μM]	51.40±4.98	55.89±6.38	57.63±6.62	57.34±4.08
Урея [mM]	9.01±0.48	8.21±0.25	8.58±0.51	8.83±0.41
TG [mM]	2.00±0.14	2.15±0.19	2.13±0.19	1.78±0.17
Пикочна киселина [μM]	92.13±6.95	*79.39±5.86	86.16±7.57	89.69±3.43
MDA [μM]	1.33±0.06	*1.21±0.04	1.20±0.09	1.22±0.07
SH-groups [μM]	129.2±6.16	125.4±5.58	135.6±4.22	130.6±5.77

* $p < 0,05$ спрямо контролната група; АССС - водни извлеци от листа от *C. coggygia*

Обсъждане

Серумните нива на биохимичните маркери не показват бъбречна или чернодробна токсичност при АССС-третираните групи, в сравнение с контролната група. Стойностите на серумна урея и креатинин предполагат, че бъбречната функция не е засегната от АССС. Нивата на чернодробните активности на AST, ALT и ALP остават непроменени, което е индикатор за съхранена чернодробна функция. Установените по-ниски серумни нива на

Таблица 4. Резултати от биохимичните анализи на серум от експериментални животни, третирани с водни извлекци от листа от *C. coggygia*

Биохимични показатели	Контрола	1% AICCL	2% AICCL	4% AICCL
AST [U/L]	120.2±13.21	128.9±15.37	115.5±8.11	129.1±11.42
ALT [U/L]	31.33±2.84	30.12±2.10	34.66±2.53	33.33±3.14
ALP [U/L]	408.0±53.43	416.4±28.45	390.3±48.32	338.6±17.28
Креатинин[μM]	51.40±4.98	55.89±6.38	57.63±6.62	57.34±4.08
Уреа [mM]	9.01±0.48	8.21±0.25	8.58±0.51	8.83±0.41
ТАГ [mM]	2.00±0.14	2.15±0.19	2.13±0.19	1.78±0.17
UA [μM]	92.13±6.95	*79.39±5.86	86.16±7.57	89.69±3.43
MDA [μM]	1.33±0.06	*1.21±0.04	1.20±0.09	1.22±0.07
SH-groups [μM]	129.2±6.16	125.4±5.58	135.6±4.22	130.6±5.77

Легенда: *P<0.05 спрямо контролната група; AICCL - водни извлекци от листа от *C. coggygia*

Не са наблюдавани значими промени в нивата на MDA като маркер за липидно окисление или в SH-групите, като маркер за антиоксидантен капацитет в хомогенати от черен дроб, бъбреци и мозък. Регистрирано е увеличение на пикочната киселина в чернодробни хомогенати за групите, третирани с 1 и 2% AICCL (p<0.001, p <0.05 спрямо контролата, съответно).

Проучване на антиоксидантно действие и субхронична токсичност на водно-етанолни инфузии от дървесина на C. coggygia при плъхове

Освен за липсата на бъбречна или чернодробна токсичност на 20% етанолна инфузия от дървесина на смрадлика (EICCW), представените в таблица 5 резултати свидетелстват и за известен благоприятен ефект върху серумния редокс статус. Общите тиоли се повишиха в отговор на третирането с EICCW - ефект, който може да се свърже с редуциращите свойства на полифенолите в инфузията. В допълнение, измерените ниски нива на MDA предполагат липсата на липидна пероксидация.

водната, петролиевоетерната и хлороформената фракция показаха незначителни АОА и съдържание на полифеноли.

Тези резултати показват, че полифенолните съединения присъстват предимно в тоталния метанолен екстракт, етилцетатнатната и бутанолната фракции. Липсата на корелативна връзка при останалите предполага, че измерената, макар и незначителна антиоксидантна активност при тях, най-вероятно се дължи на съединения, различни от фенолните.

Настоящото проучване ясно показва, че българските лечебни растения са с много висок антиоксидантен потенциал. Включването на референтни растения в списъка на изследваните ни дава възможност да направим оценка на това, къде се нареждат по отношение на антиоксидантна активност и полифенолно съдържание най-популярните лечебни растения използвани в нашата народна медицина. Вижда се, че повече от половината от изследваните видове са с измерени АОА и съдържание на полифенолни в техните екстракти по-високи или съизмерими с тези на референтните растения. Резултатите от проведените проучвания демонстрират убедително високия антиоксидантен потенциал на група растения, сред които *C. coggygia*, *S. ebulus* и *A. eupatoria*. Поради тази причина е предприето едно по-задълбочено проучване на антиоксидантния потенциал на избрани български лечебни растения, а именно *C. coggygia*, *S. ebulus* и *A. eupatoria*. Резултатите от изследванията на фитохимичния състав на растения като бязак, камшик и смрадлика и идентифицирането на съставки от значение за проявата на АОА и/или противовъзпалителното действие на билките дават възможност проучване на биологичното им действие в модели на живи системи, включващи клетъчни култури, експериментални животни и хора.

2. Изследване антиоксидантното действие на български лекарствени растения върху клетъчни култури

За изучаване ефектите на извлеци и екстракти от лечебни растения широко се използват модели на клетъчни култури. Все по-зачестяващите случаи на затлъстяване и свързаните с него нарушения като инсулинова резистентност и метаболитен синдром доведоха до фокусиране на много изследвания върху мастна тъкан. Въпреки, че съществуват някои важни разлики между адипогенезата при мишки и хора (Wang et al., 2004), голяма част от изследванията, касаещи адипозна тъкан, се извършват върху миша преадипоцитна клетъчна линия 3T3-L1. Тази клетъчна линия е подходяща за изследване на параметри на оксидативния стрес, както и на инфламаторни патологични състояния, характерни при затлъстяване и диабет тип 2. Известно е, че затлъстяването е съпроводено с макрофажна инфилтрация на адипозната тъкан (Bourlier et al., 2009). В мастна тъкан «съжителстват» адипоцити, преадипоцити, макрофаги. Между тях се извършва един непрекъснат обмен на адипокини и цитокини (“cross-talk”). Продуцираните от мастните клетки адипокини влияят върху макрофагите, а секретиранияте от макрофагите възпалителни и други фактори повлияват метаболизма на адипоцитите. В този смисъл проучванията върху макрофажни клетъчни култури биха хвърлили допълнително светлина върху този метаболизъм от гледна точка на идентифициране на билки с антиоксидантно и противовъзпалително действие. Настоящите експерименти са проведени върху J774A.1 миши макрофаги и миши преадипоцитни 3T3-L1 клетки.

МТТ тест за цитотоксичност

На фиг. 6 са представени сравнителни данни за цитотоксичността на водно-алкохолни екстракти от 12 български лечебни растения, отличаващи се с високо общо съдържание на полифеноли и антиоксидантен капацитет.

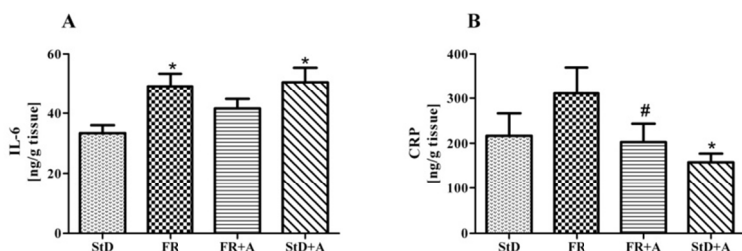
именно, че фруктозата предизвиква увеличаване на IL-6 и CRP в черния дроб на животни обременявани с фруктоза.

Лечението на нискостепенно възпаление с конвенционални лекарства може да бъде избегнато като се замени с билкови препарати с потенциално противовъзпалително действие. В подкрепа на данните за противовъзпалителната активност на камшика, добавянето на билков екстракт към стандартната диета на експерименталните животни (група СД+А) довежда до намаляване нивата на CRP. Изненадващо е наблюдаваното увеличение на IL-6 нивата в същата група след 12 седмично третиране. Получените от нас данни биха могли да показват възможно имуномодулиращо действие на билката. В предишни наши проучвания бе показано, че екстракт от *A. eupatoria* повишава и генната експресия на IL-6 в мастната тъкан на плъхове на стандартна диета (Kisselova-Kaneva et al., 2012.). Това, заедно с установения инхибиторен ефект на екстракта върху CRP, ни позволява да заключим, че *A. eupatoria* проявява имуномодулиращи свойства в експериментален модел на фруктозо-индуцирани метаболитни нарушения.

*Антиоксидантно действие и субхронична токсичност на водни инфузии от листа на *C. coggygria* при плъхове*

Биохимичните измервания не показаха значими промени в черния дроб и бъбреците на третираните с водни извлеци от листа от *C. coggygria* (AICCL) групи, в сравнение с контролната група. Не се наблюдават значителни разлики в серумните активности на чернодробните ензими (AST, ALT, ALP), както и в серумни концентрации на TG, креатинин, урея, и SH-групите. Установено е, обаче, значително намаляване на пикочната киселина и MDA в групата, третирана с 1% AICCL (P<0.05 спрямо контролата) (Таблица 4).

($p < 0.05$ в сравнение с СД групата). Количествените изменения в нивата на IL-6 в чернодробна тъкан при отделните групи са представени на фиг. 23А.

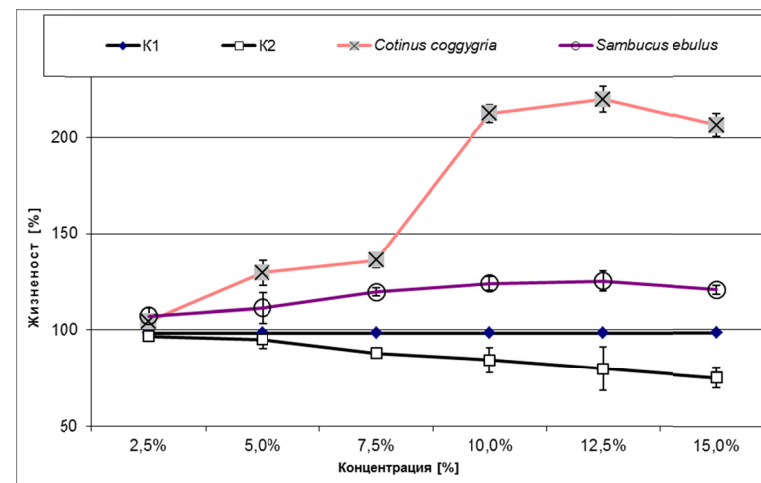


Фигура 23. Концентрация на IL-6 (А) и CRP (В) в черен дроб на плъхове след 12 седмично третиране. StD – стандартна диета, FR – фруктозна диета, А-екстракт от АЕ. Данните са представени като mean±SEM; * $p < 0.05$ спрямо СД, # $p < 0.05$ спрямо Фр.

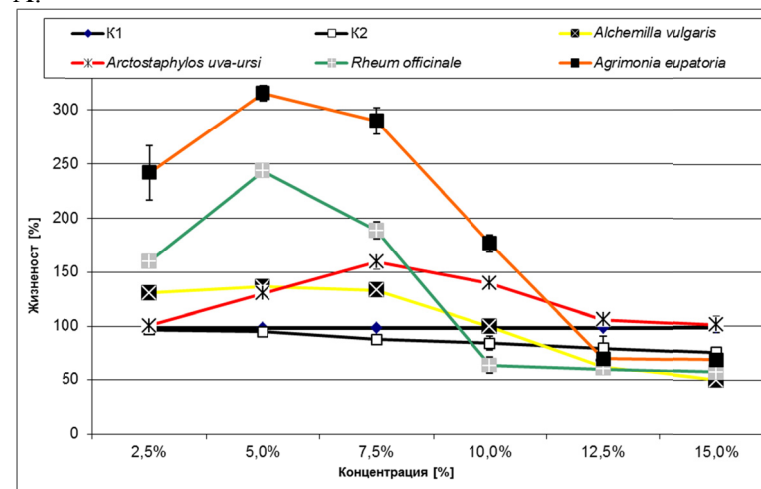
Високо-фруктозната диета предизвика леко повишение в нивата на CRP в черен дроб в сравнение с нивата при плъхове на стандартна диета, като разликите не са статистически значими. Значими разлики в концентрациите на CRP са установени при СД+А и СД групите (фиг. 23В).

Обсъждане

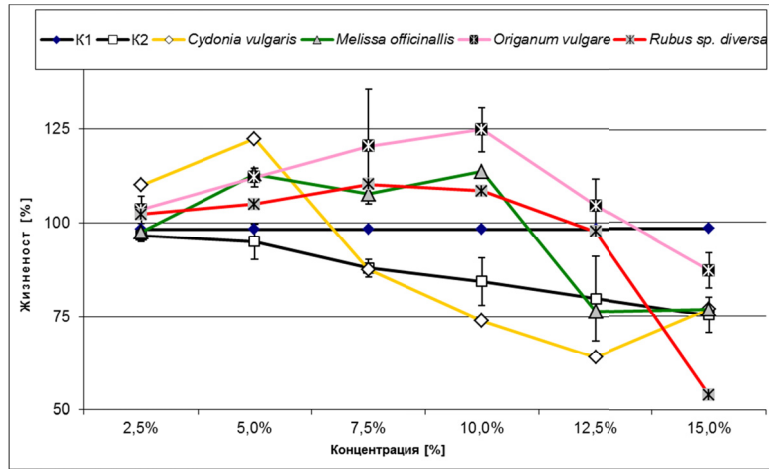
През последните три десетилетия фруктозата е широко използвана като основен подсладител в хранително-вкусовата промишленост и като заместител на захарта в диетата на пациенти с диабет. Обаче, все повече доказателства сочат фруктозата като причина за неалкохолна стеатозна болест на черния дроб (НАСБ), придружена от възпаление и отлагане на липиди (Nomura et al., 2012). Хроничното възпаление при затлъстяването се свързва с развитието на метаболитен синдром и диабет тип 2 и се докладва за увеличение на възпалителните цитокини като TNF α , IL-6, MCP-1 и IL-1 (Bastard et al., 2006.). При пациенти със затлъстяване тези цитокини и хемокини корелират с нива на CRP – маркер за системно възпаление. В подкрепа на тези данни са тук представените резултати, а



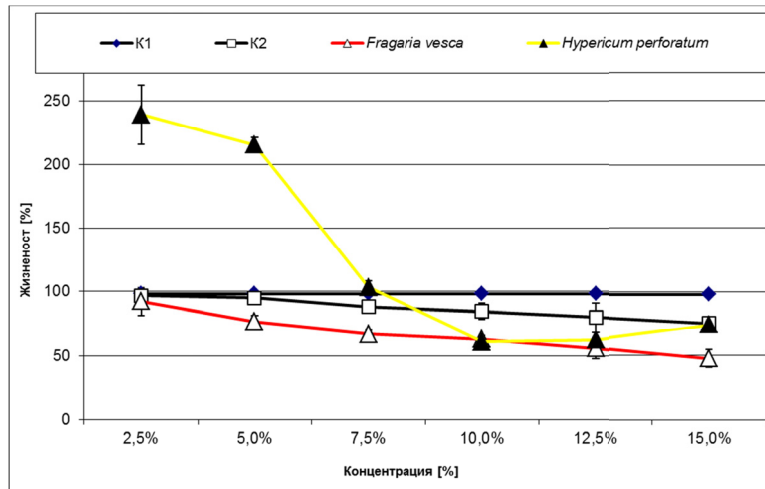
А.



Б.



В.



Г.

Фигура 6, А-Г. Промени в жизнеността на 3Т3 – L1 клетки след третиране с различни концентрации на 40% водно-етанолови екстракти от 12 български лечебни растения. K1 и K2 - контроли: K1 – нетретираните клетки, към които е добавена свежа хранителна среда без серум; K2 - контрола на екстрактите (40% водно етанолов разтвор).

3. Изследване биологичното действие на избрани български лекарствени растения върху модели на експериментални животни

Класическите фармакологични и токсикологични проучвания включват последователно тестване на нови вещества *in vitro*, последвано от тестване върху експериментални животни. Подходите с използване на експериментални животни се характеризират с относително висока релевантност и получените от животинските модели данни се екстраполират при човека. Тази глава представя резултати от изследвания върху антиоксидантното и противовъзпалително действие на *A. eupatoria* при експериментални животни на стандартна диета, както и в модел на индуцирани метаболитни нарушения. Докато в литературата са налични данни за противовъзпалителното действие на *S. ebulus*, получени при използването на животински модели, то проучвания върху активността на *C. cogggyria* почти липсват. Единичните съобщения се отнасят до проявата на генотоксичност при животни, въпреки че данните от народната медицина свидетелстват и за оралното ѝ традиционно приложение. Затова нашите проучвания, представени в тази част, изследват токсичността на *C. cogggyria* с оглед възможността за по-нататъшно приложение на билката при различни модели на експериментални животни.

Влияние на A. eupatoria върху нивата на IL-6 и CRP в черен дроб на плъхове с фруктозо-индуцирани метаболитни нарушения

Установено е значително увеличение в концентрацията на IL-6 в черен дроб на животни, приемали богата на фруктоза диета, в сравнение с групата на стандартна диета ($p < 0.05$). Въпреки че различията между Фр и Фр+АЕ групи не са статистически значими, се наблюдава тенденция за намаляване нивата на цитокина във втората група. Дванадесет седмичното третиране с екстракт от камшик (група СД+АЕ) доведе до увеличаване на нивата на IL-6

Те имат добре документирани множество активности, такова като антиоксидантна, антиканцерогенна, противовъзпалителна кардиопротективна, антиатерогенна, подобряване на ендотелната дисфункция, инхибиция на ангиогенезата и клетъчна антипролиферативна активност (Valianou et al., 2009 и др.). Една от малкото публикации по темата визира физетин, изолиран от екстракти на смрадлика, за който се съобщава, че инхибира индуцираната при хипергликемия цитокинова продукция в моноцити чрез епигенетични промени по сигнален път с участие на NF-κB (Kim et al., 2012). Това дава основание на авторите да предложат употребата на физетин като добавка за превенция на диабет. Настоящото проучване е първото, в което се установява стимулиране на експресията на гените за PPARγ и адипонектин в преадипоцитна 3T3-L1 клетъчна култура под действие на ЕА фракция на *C. cogggyria*, в съгласие с оскъдните съобщения в литературата и данни основно от народната медицина на Балканите за вътрешната употребата на иначе считаната за токсична смрадлика при диабет, възпаления с различна етиология и сърдечно-съдови заболявания (Kültür, 2007; Chang et al., 2009; Ланджев, 2010).

В заключение, резултатите за ефекта на *A. eupatoria* и *C. cogggyria* върху експресията на проинфламаторните цитокини и маркерите за противодиабетна активност, установяват потенциал на широко прилаганите в българската народна медицина билки камшик и смрадлика да повлияват механизмите свързани с изява на инсулинова резистентност по два начина – директен ефект върху експресията на PPARγ и адипонектин и индиректно, инхибирайки факторите, поддържащи нискостепенното възпаление, съпътстващо метаболитните нарушения при диабета.

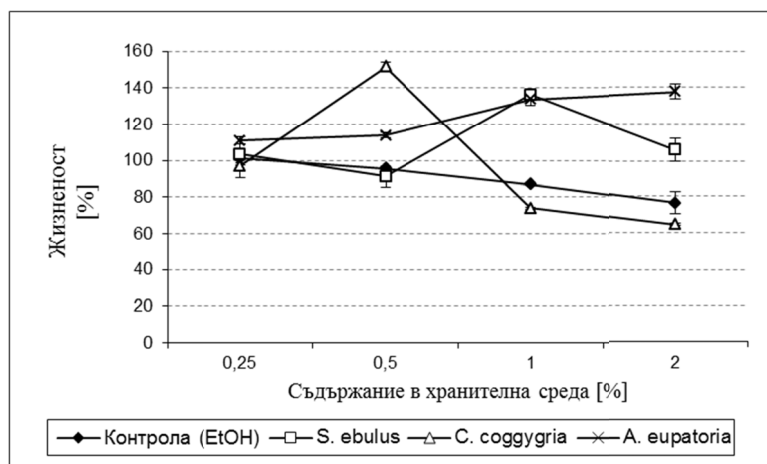
Обсъждане

Установено е, че ефектът на екстрактите върху жизнеността на клетките е различен. Повечето от екстрактите (фиг. 6А-В) имат стимулиращ ефект върху жизнеността на клетките в сравнение с контролите. Когато се прилагат в ниски дози, екстрактите от *Cotinus coggygia*, *Alchemilla vulgaris*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Rheum officinale*, *Sambucus ebulus*, *Agrimonia eupatoria*, *Cydonia vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Rubus* sp. *diversa*, *Melissa officinalis* имат по-скоро стимулиращ еднотипен ефект върху клетките, отколкото цитотоксичен. Резултатите могат да бъдат обяснени със стимулиращ ефект на екстракта върху клетъчния растеж или с активирането на клетъчни ензимни системи, участващи в редуцирането на МТТ. Повечето от тях не оказват токсично действие и в по-високите концентрации на диапазона, в който е проведено проучването (фиг. 6Б). При някои екстракти първоначално стимулиране е последвано от намаляване на жизнеността с увеличаване на концентрацията на екстракта (фиг. 6В). Намалената клетъчна жизненост след прилагане на високи дози на екстракта вероятно се дължи за токсичен ефект на някои от компонентите върху клетките. Останалите екстракти (от *Fragaria vesca* и *Hypericum perforatum*) (фиг. 6Г) понижават клетъчната жизненост, без да индуцират първоначалното ѝ стимулиране.

Резултатите от тези експерименти позволяват да се заключи, че повечето от изследваните растения не оказват токсично действие върху жизнеността на 3T3-L1 преадипоцити. С оглед приложението на различни видове екстракти или фракции за по-нататъшно проучване на биологичната им активност, са провеждани съответно изследвания за ефекта им освен върху жизнеността на 3T3-L1 преадипоцити, и върху J744A.1 макрофаги.

Влияние на етилацетатна фракция на тотален метанолов екстракт от *Agrimonia eupatoria* и *Cotinus coggygria* и от плодове на *Sambucus ebulus* върху жизнеността на 3T3-L1 преадипоцити

При прилагане на нарастващи концентрации в диапазона 0,25 – 2,0% на ЕА фракция от *Agrimonia eupatoria* и *Cotinus coggygria* и от плодове на *Sambucus ebulus*, бе наблюдавано увеличение на жизнеността на клетките спрямо контролата третирана с PBS (100% жизненост), както следва: за *A. eupatoria* при 1,5%, за *S. ebulus* при 1,0% и за *C. coggygria* при 0,5% концентрация на съответната фракция. В избрания концентрационен диапазон бе установен цитотоксичен ефект само за *C. coggygria* при концентрация 1% (фиг. 7). Тези резултати са основание при всички следващи изследвания да са прилагани по две концентрации от всяка билка – тази, при която се наблюдава пик в стимулиране на жизнеността и предхождащата я концентрация.



Фигура 7. Промяна в жизнеността на 3T3-L1 клетки, третирани с етилацетатна фракция на тотален метанолов екстракт от *Sambucus ebulus*, *Agrimonia eupatoria* и *Cotinus coggygria*.

профилактика на тези заболявания. Знае се, че този адипокин потиска експресията на TNF α – фактор, свързан с патогенезата на инсулиновата резистентност. Активиран от тиазолидиндионовите препарати PPAR γ рецептор има поне два пътя на действие, единият от които е т. нар. адипонектин-зависим път, чрез който се стимулира секрецията на адипонектин, а оттам се подобряват инсулиновата чувствителност и глюкозният метаболизъм (Iwaki et al., 2003; Kadowaki et al., 2006).

До момента в литературата липсват данни за ефекта на *A. eupatoria* и *C. coggygria* върху нивата на адипонектин или PPAR γ . Единствените сходни публикации визират друг вид от същия род – *Agrimonia pilosa* L., ЕА фракция от която оказва противоположен инхибиращ, а не стимулиращ ефект върху PPAR γ (Lee et al., 2012). Ahn et al. (2012) първоначално установяват инхибиращ ефект на ЕА фракция на *A. pilosa* върху диференциацията на 3T3-L1 клетки (Lee et al., 2012), в последствие изолират и активната съставка от фракцията (1 β -хидрокси-2-оксопомолева киселина), която потиска преадипоцитната диференциация и адипогенезата чрез инхибиране на PPAR и регулаторния протеин C/EBP α в 3T3-L1 cells (Ahn et al., 2012). Нашето проучване е първото, в което се установява стимулиране на експресията на гените за PPAR γ и адипонектин в преадипоцитна клетъчна култура под действие на лекарственото растение *A. eupatoria*, в подкрепа на данните от литературата за антихипергликемично, инсулин стимулиращо, както и инсулино подобно действие на воден екстракт и сушени листа от растението в експериментални модели на опитни животни (Swanston-Flatt et al., 1990; Gray et al., 1998).

Ефектът на ЕА фракция на *C. coggygria* върху нивата на иРНК за PPAR γ и адипонектин би могъл отчасти да се обясни с високото съдържание на галова киселина, за която се установява ефект в модели на стрептозотоцин-индуциран диабет, както и с най-застъпените групи биологично активни вещества в екстрактите от смрадлика – флавоноидите катехин, физетин, кверцетин, фустин, бутин.

ниво превенция. Като първа стъпка на тези проучвания са изследванията върху клетки, особено такива от мастна тъкан с оглед идентифицирането на вещества с регулиращо действие върху адипозния метаболизъм. В този смисъл преадипоцитната 3T3-L1 клетъчна линия се явява подходящ модел за такива проучвания. Третирането на клетките с фракциите с най-високо съдържание на антиоксиданти, сред които съединения с полифенолна природа, цели да проучи ефекта им върху експресията на характерни за мастна тъкан адипокини (в частност адипонектин), както и върху PPAR γ рецептора. Ефектът на стимулирана експресия на рецептора е особено добре изразен при камшика и смрадликата. В отсъствие на възпалителен стимул фракцията от *S. ebulus* приложена в концентрация 1% също има стимулиращо действие. В присъствие на индуктори на възпалението (кондиционирана среда) *A. eupatoria* и *C. coggygria* стимулират експресията на гена за PPAR γ . Тези резултати дават основание да се смята, че тези две растения имат висок потенциал като суплементи и дори като терапевтици в контрола на диабет тип 2. Това, че от една страна растителните препарати стимулират експресията на проинфламаторните цитокини, а същевременно повишават нивата на иРНК за PPAR γ , дава основание да предположим, че ефектите им се осъществяват по различни сигнални пътища. В бъдещи изследвания, включително и такива при експериментални животни, би било интересно да се проучи степента на корелация между увеличените нива на иРНК на PPAR γ и транскрипционната активност на PPAR γ в качеството му на транскрипционен фактор.

Адипонектинът е продуциран от адипоцити инсулин-сенситизиращ хормон с антидиабетни, противовъзпалителни и антиатеросклеротични свойства. Намалването на серумните нива на адипонектин при затлъстяване се счита за независим рисков фактор за диабет и ССЗ, което предполага, че фармакологична намеса, насочена към повишаване производство на адипонектин, би могла да бъде обещаващ подход за лечение и/или

Обсъждане

В литературата се споменава предимно за цитотоксичен ефект на различни растителни екстракти, и то главно върху туморни клетки, като с това се обяснява евентуалното им противораково действие (Dzhambazov et al., 2002; Chao & Chu, 2004). При адипоцити също се докладва предимно цитотоксично действие във връзка с антиадипогенна активност на екстракти. Водни и метанолови екстракти от *Capsicum annuum*, например, са цитотоксични за 3T3-L1 клетки (Agumugam et al., 2008), а Sahib и съавтори (2010) установяват цитотоксично действие на екстрактите от други три растителни вида върху 3T3-L1 преадипоцити. Полученият резултат за стимулирана клетъчна пролиферация вместо за цитотоксичен ефект на извлека от смрадлика е в противовес с обобщението на Hsu et al. (2006, 2007), които установяват, че галовата киселина (основното фенолно съединение в смрадликата) предизвиква апоптоза при 3T3-L1 преадипоцити. Някои автори, обаче, съобщават и за про-пролиферативно действие на екстракти от лечебни растения (Manosroi et al., 2005; Kim et al., 2010) като свързват това с имуностимулиращото им действие.

Храни, богати на полифеноли, витамини и други съединения с АОA повлияват положително развитието на заболявания свързани с оксидативният стрес и неговите ефекти върху жизнеността на клетките (Harborne & Williams, 2000; Tapiero et al., 2002). Подобни съединения биха подпомогнали АО системи на клетките способността си да активират експресията на ензими свързани с АО защита (Wilkinson & Clapper, 1997; Carlsen et al., 2003). Така преживяемостта на клетките би се увеличила в някои случаи и биха се активирали и механизми, активиращи клетъчната пролиферация.

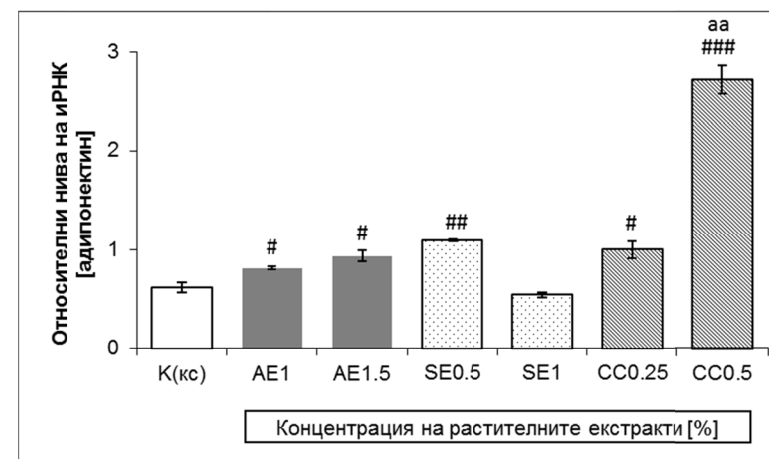
В настоящото проучване екстракт от *Agrimonia eupatoria* приложен в концентрации от 1,25% до 2,5% при J744A.1 линия и до 5% при 3T3-L1 преадипоцитна линия имаше стимулиращ ефект върху клетъчната пролиферация. Допълнително е установен дори протективен ефект на

етилацетатна фракция на тотален метанолов екстракт от *Sambucus ebulus* върху етанол-индуцирана цитотоксичност на 3T3-L1 клетки. Настоящите проучвания показват, че етанолът води до дозозависимо намаляване на клетъчната жизнестойност и в концентрация 0.625% е причина за смъртност на 46% от клетките. Едновременното третиране с етилацетатна фракция на тотален метанолов екстракт от *Sambucus ebulus* има за резултат увеличаване на жизнестойността до 137% в сравнение с контролната група, демонстрирайки цитопротективно действие на *S. ebulus* по отношение на преадипоцити.

Увеличаване жизнестойността на клетки, третирани с етилацетатната фракция на екстракти от *A. eupatoria*, *S. ebulus* и *C. coggugria* вероятно се дължи на освобождаването на фактори, стимулиращи клетъчната пролиферация. Проявената цитотоксичност при относително ниски концентрации смрадика (1% в културалната среда) предполага, че, освен високо полифенолно съдържание (най-високо от трите растения), в етилацетатната фракция на екстракта вероятно са концентрирани и токсични за клетките компоненти.

Все повече са доказателствата, че ефектите на флавоноидите се дължат на способността им да взаимодействат с протеини, съществени за вътреклетъчните сигнални каскади (Williams et al., 2004). Пролиферативният ефект на екстрактите би могъл да се обясни със способността на някои фенолни съединения да активират MAP сигналните каскади (Kong et al., 2000).

Цитотоксичното действие на екстрактите се обяснява със способността на някои фенолни съединения да инхибират клетъчното делене и да индуцират апоптоза. Например, за кверцетин е установено, че може да индуцира апоптоза в 3T3-L1 адипоцити като понижава степента на фосфорилиране на ERK и JNK и модулира медираните от тях сигнални пътища (Ahn et al., 2008). Дали екстрактът ще прояви цитотоксично действие или ще стимулира клетъчната пролиферация, зависи от приложената



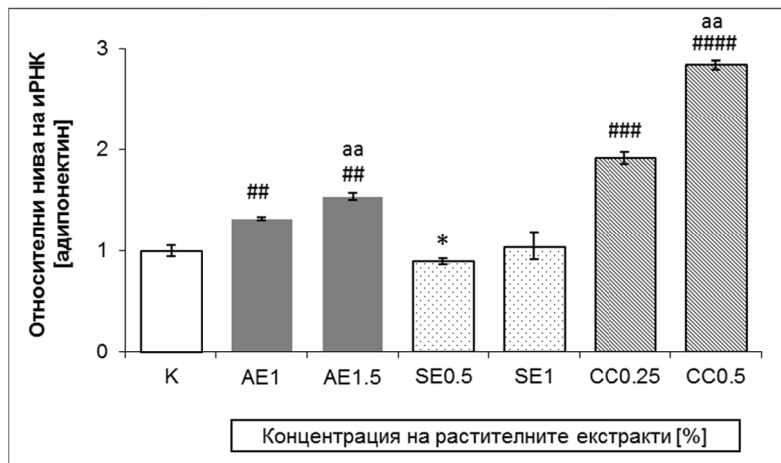
Фигура 22. Експресия на адипонектин в 3T3-L1 клетки, третирани с избрани концентрации на ЕА фракция от изследваните билки при използването на индуктор на възпаление

K(к)-контрола (клетки в кондиционирана среда), AE (*A. eupatoria*), SE (*S. ebulus*), CC (*C. coggugria*); цифровите индекси показват приложената концентрация в проценти

$p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, увеличение в нивата на иРНК, спрямо контролата; aa $p < 0.01$, спрямо другата концентрация на съответния екстракт

Обсъждане

PPAR γ принадлежат към суперсемејството на ядрените рецептори и участват регулацията на липидния и глюкозен метаболизъм и диференциацията на адипоцитите. Съществуват доказателства, че регулират транскрипционното ниво на лептин, резистин и адипонектин (Steppan et al., 2001; Maeda et al., 2001; Daynes & Jones, 2002; Chui et al., 2005). Техни лиганди могат да бъдат както ендогенни, така и екзогенни вещества, включително и синтетични лекарствени препарати. Обект на науката днес са разнообразни природни вещества или растителни извлеци, екстракти и други форми, потенциални лиганди на PPAR γ , които да могат да участват в контрола на диабета, още на



Фигура 21. Експресия на адипонектин в 3Т3-Л1 клетки, третирани с избрани концентрации на ЕА фракция от изследваните билки

К-контрола (клетки култивирани без индуктор на възпаление), АЕ (*A. eupatoria*), SE (*S. ebulus*), СС (*C. coggygria*); цифровите индекси показват приложената концентрация в проценти

$p < 0.01$, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$ увеличение в нивата на иРНК, спрямо контролата; * $p < 0.05$ понижение в нивата на иРНК, спрямо контролата; aa $p < 0.01$, спрямо другата концентрация на съответния екстракт

Значително увеличение в нивата на иРНК на адипонектин се наблюдава при третиране с *A. eupatoria* и *C. coggygria*, както при клетки без индуктор на възпаление, така и в условия на индуцирано възпаление, като и при двете билки ефектът е концентрационно зависим. Не така категорични са резултатите за *S. ebulus*. Третирането с ЕА фракция на тази билка не предизвиква промяна в нивата на адипонектина.

концентрация. Ниски концентрации стимулират експресията на гени, свързани с пролиферация, а високи концентрации активират каспазните каскади, инициращи апоптоза (Kong et al., 2000). Ефектът обаче, очевидно се определя и от типа на екстрагента и веществата, съдържащи се в извлека или екстракта, както и от типа клетки.

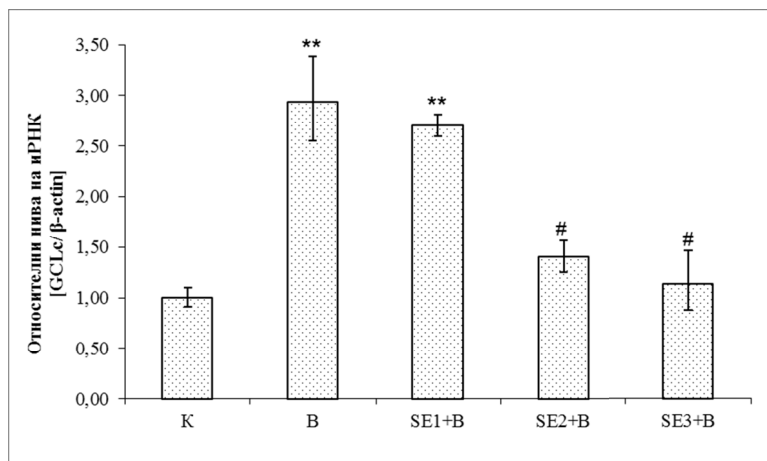
Влияние на растителни екстракти върху експресията на редокс сензитивни гени

Изследвана е експресията на ензими от обмяната на глутатион, пряко свързани с клетъчната антиоксидантна защита - γ -глутамат цистеин лигаза (GCL) и глутатион пероксидаза (GPx-4). Проучването на действието на екстракта от бъзак върху експресията на скоростопределящия ензим в *de novo* синтеза на глутатион – γ -глутамат цистеин лигаза показва, че самият екстракт стимулира приблизително два пъти експресията на каталитичната субединица на GCL (cGCL), включително като проявява и дозозависим ефект (фиг. 8).

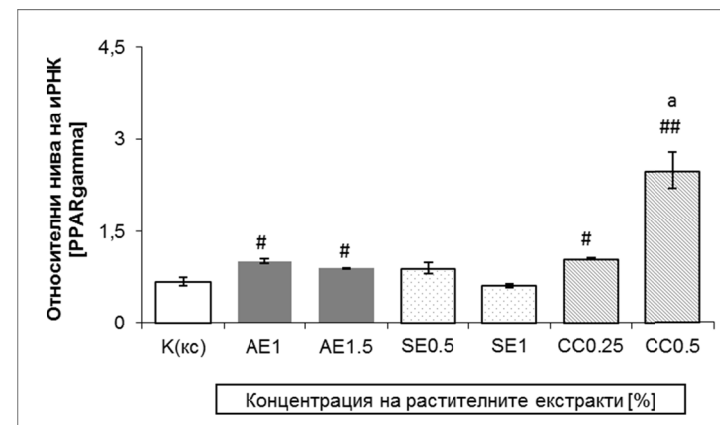


Фигура 8. Влияние на различни концентрации на воден извлек от *Sambucus ebulus* върху експресията на GCL в нестимулирани 3Т3-Л1 преадипоцити (* $p < 0,05$ спрямо К)

При концентрация на извлек от 5% в културалната среда се отчита статистически значимо повишение в степента на експресията на гена за GCL, като при концентрация на извлек от 10% се достига близо два пъти и половина индукция спрямо контролната група нетретирани клетки. t-ButOОН води до индуциране на експресията на ензима, при това в значителна ($p < 0,01$) степен (близо три пъти) спрямо групата нетретирани клетки (фиг. 9). Претретиране с воден екстракт от *S. ebulus* и последващо прилагане на t-ButOОН също предизвиква увеличение на нивото на генна експресия на GCL, в сравнение с контролата. При претретиране с извлек от бъзак и последващо прилагане на оксидант степента на индукция на ензима бе значително по-ниска спрямо степента на индукция предизвикана само от оксиданта ($p < 0,05$), което може да се счита като резултат от протективното, антиоксидантно действие на екстракта.



Фигура 9. Влияние на воден извлек от *Sambucus ebulus* върху експресията на GCL в оксидативно стимулирани 3T3-L1 клетки. (** $p < 0,01$ спрямо К; # $p < 0,05$ спрямо В) К – контрола (нетретирани клетки); В – 100μM t-ButOОН; SE1+B – екстракт от *S. ebulus* (2,5%) в хранителна среда + 100μM t-ButOОН;

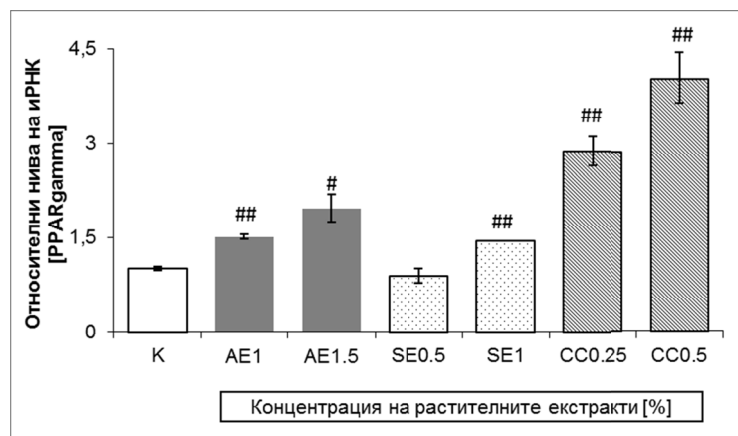


Фигура 20. Експресия на PPAR γ в 3T3-L1 клетки, третирани с избрани концентрации на ЕА фракция от изследваните билки при използването на индуктор на възпааление

К(к)-контрола (клетки в кондиционирана среда), АЕ (*A. eupatoria*), SE (*S. ebulus*), СС (*C. coggygia*); цифровите индекси показват приложената концентрация в проценти # $p < 0,05$ увеличение в нивата на иРНК, спрямо контролата; ^a $p < 0,05$, спрямо другата концентрация на съответния екстракт

Ефектите на ЕА фракции от тотални екстракти на *A. eupatoria*, *S. ebulus* и *C. coggygia* върху експресията на гена за адипонектин са представени съответно на фиг. 21 и 22.

адипонектин. При трите изследвани растения беше установен стимулиращ ефект върху експресията на гена за PPAR γ в клетки, култивирани в отсъствие на индуктор на възпаление, като за *A. eupatoria* и *C. cogygria*, но не и за *S. ebulus*, този ефект се наблюдава и в условията на индуцирано възпаление (фиг. 19-20).

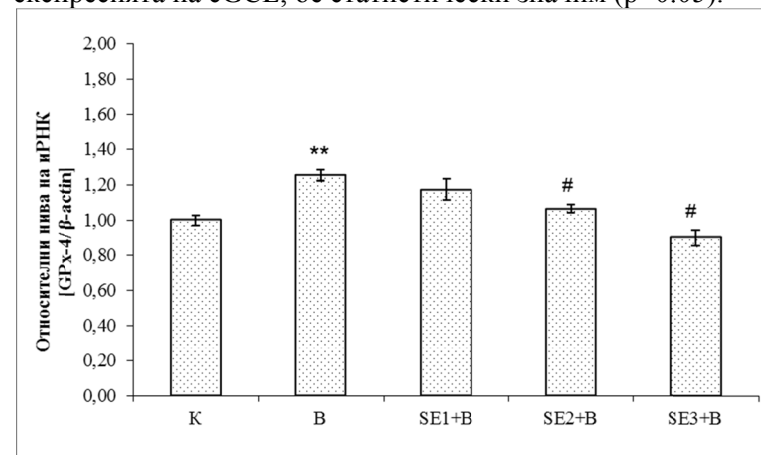


Фигура 19. Експресия на PPAR γ в 3Т3-L1 клетки, третирани с избрани концентрации на ЕА фракция от изследваните билки

К - контрола (клетки култивирани без индуктор на възпаление), АЕ (*A. eupatoria*), SE (*S. ebulus*), СС (*C. cogygria*); цифровите индекси показват приложената концентрация в проценти. # $p<0.05$, ## $p<0.01$ увеличение в нивата на иРНК, спрямо контролата

SE2+B – екстракт от *S. ebulus* (5%) в хранителна среда + 100 μ M t-ButOOH; SE3+B – екстракт от *S. ebulus* (10%) в хранителна среда + 100 μ M t-ButOOH.

Претретиране на 3Т3-L1 клетки с водния екстракт от плодове на бъзак повлия доведе до понижаване в нивата на иРНК за GPx-4 спрямо групата, третирана с оксиданта t-ButOOH (фиг. 10). Ефектът върху експресията на GPx-4, макар и по-слабо изразен в сравнение с този върху експресията на cGCL, бе статистически значим ($p<0.05$).



Фигура. 10. Влияние на воден извлек на *S. ebulus* върху експресията на GPx-4 в оксидативно стимулирани 3Т3-L1 клетки. (** $p<0,01$ спрямо К, # $p<0,05$ спрямо В)

К – контрола (нетретирани клетки); В – 100 μ M t-ButOOH; SE1+B – екстракт от *S. ebulus* (2.5%) в хранителна среда + 100 μ M t-ButOOH; SE2+B – екстракт от *S. ebulus* (5%) в хранителна среда + 100 μ M t-ButOOH; SE3+B – екстракт от *S. ebulus* (10%) в хранителна среда + 100 μ M t-ButOOH.

Наличните в екстрактите полифеноли, сред които не малка част антоцианини в екстракта от бъзак, имат способността да свързват и обезвреждат свободни радикали, така до известна степен те компенсират необходимостта от такова индуциране на антиоксидантна защита, каквото се наблюдава при действие само на оксиданта t-ButOOH.

Обсъждане

Третирането на клетъчни култури на преадипоцити и макрофаги с оксидативния агент t-ButOON доведе до стимулиране на експресията на изследваните гени от обмяната на глутатион. И други автори съобщават за промяна в експресията на ензими, участващи в антиоксидантната защита вследствие на третиране с оксидативни агенти (Kobayashi et al., 2009; Zhang et al., 2005), като установяват стимулирана транскрипция на множество гени, свързани с клетъчния отговор към стрес и преживяването на клетката. GCL е изграден от две субединици - каталитична и регулаторна, като каталитичната субединица се регулира на транскрипционно и посттранскрипционно ниво (Lu, 1999). Транскрипционният контрол се опосредства от няколко респонсни елемента в промотора на гена за регулаторната субединица, в т.ч. ARE/EpRE елементи, свързващо място за NF-kB и XRE (Mulcahy et al., 1997; Myhrstad et al., 2002). ARE/EpRE се откриват в промоторите и на други гени, които участват в антиоксидантната защита. Значително по-малко е известно за регулацията на експресията на GPx4, за която се предполага, че се индуцират от наличието на оксиданти. Banning и съавт. (2005) установяват, че гастроинтестиналната изоформа на GPx2 се контролира от ARE/EpRE. Активността на тези респонсни елементи се регулира от изменения в редокс баланса в клетката, най-вероятно медирано от сулфхидрилни групи (Meuer et al., 1994). Глутатионовата система е ключова и действа като клетъчен редокс буфер и de novo синтезът на глутатион е най-важният механизъм, осигуряващ увеличение на нивата на редуциран GSH в отговор на оксидативен стрес (Rahman, 2005). Регулацията на GCL е особено важна за поддържането на тези нива.

Измерването на нивото на генна експресия показва, че прилагането на воден извлек от *Sambucus ebulus* стимулира статистически достоверно и в концентрационна зависимост генната експресия на cGCL в нестимулирани 3T3-L1 клетки.

таргет на етаноловото действие, отколкото се е предполагало до момента (Tang et al., 2011). Това е свързано както с ролята ѝ при изявата на метаболитен синдром и свързаните с него заболявания, така и с чернодробните увреждания, съпътстващи алкохолна злоупотреба. *In vivo* хронична консумация на етанол предизвиква увеличение на IL-6 и TNF- α нивата в АТ на плъхове (Kang et al., 2007), а при хора нивата на IL-6 и TNF- α в АТ корелират с чернодробните увреждания, предизвикани от алкохола (Naveau et al., 2010).

Данните от настоящото проучване позволяват да заключим, че етанолът може да увеличава възпалителния потенциал на адипозна тъкан, като стимулира експресията на възпалителни цитокини IL-6 и TNF- α и ензими на възпалителния отговор iNOX и COX-2 на транскрипционно ниво.

Нормализирането на генната експресия на ензимите COX-2 и iNOS, както и на проинфламаторните фактори TNF- α и IL-6 при претретиране с ЕА фракция от *S. ebulus* потвърждава съобщаваното от народната медицина противовъзпалително действие на бъзака, за което са получени първите научни доказателства. Същевременно, би могло да се разглежда и негово потенциално протективно действие при алкохолни интоксикации и увреждания, свързани с прием на алкохол. Такива проучвания биха имали практическо приложение и представляват интерес за по-нататъшни изследвания.

Експресия на таргетни гени за оценка на противодиабетно действие на български медицински растения при модели на клетъчни култури при използването на кондиционирана среда като индуктор на възпаление

За проучването на противодиабетния потенциал на *A. eupatoria*, *S. ebulus* и *C. coggygria* бе изследван ефектът на ЕА фракции върху експресията на гена за пероксизом пролифератор-активиращ рецептор гама (PPAR γ) и гена за

на първични човешки клетки от мастна тъкан с етанол (Wandler et al., 2008). Настоящото проучване установява корелация между концентрацията на етанола и регулирането на генна експресия за IL-6 и TNF- α . Значителното индуциране експресията и на втория набор от възпалителни маркери - COX-2 и iNOS при третиране с етанол също бе зависимо от концентрацията на етанола. По подобен начин третиране с етанол повишава експресията на iNOS и COX-2 в мозък на плъхове и в нервни клетки (Vallés et al., 2004; Blanco & Guerri, 2007), а също и в черен дроб на плъхове (Nanji et al., 1997).

Настоящото изследване представя доказателства, че етанолът може да индуцира възпалителен отговор в 3T3-L1 предипозити чрез увеличаване на експресията на провъзпалителни маркери. Ефектът на етанол върху възпалителните цитокини и ензими, участващи във възпалението, би могъл да се отдаде на неговата способност да променя сигнални пътища. Етанолът може да се свързва с хидрофобни домени на протеините и по този начин да променя активността на йонни канали, невротрансмитерни рецептори и сигнални протеини (Wilkemeyer et al., 2000, Brodie et al., 2007). Транскрипцията на IL-6 и TNF- α и ензими COX-2 и iNOX се медира от NF- κ B (Blanco et al., 2004; Michelsen et al., 2004). Доказано е, че NF- κ B активността и транскрипцията му се повишават след третиране с етанол (Davis & Syarin, 2004, Jeong et al., 2005, Blanco & Guerri, 2007). Като транскрипционен фактор NF- κ B е таргет на множество сигнални пътища, включително на медирания от Toll-подобните рецептори (TLRs) сигнален път. Получени са доказателства, че ефектът на етанол върху TNF- α , COX-2 и iNOX в астроцити и HMC-1 клетки се осъществява посредством TLR рецепторите (Blanco et al., 2005; Fernandez-Lizarbe et al., 2008). Тъй като адипоцити, както и предипозити, експресират широк набор от TLRs (Pietsch et al., 2006), продукцията на цитокини в тях биха могла да бъде специфично стимулирана по този сигнален път. Адипозната тъкан може би ще се окаже по-важен

Подобен индуциращ ефект върху транскрипцията на GCL се установи и за водно-етанолов екстракт от *Agrimonia eupatoria* при преадипозити и J774A.1 макрофаги. Наличните в екстрактите полифеноли, сред които не малка част антоцианини в екстракта от бъзак, имат способността да свързват и обезвреждат свободни радикали, като така до известна степен те компенсират необходимостта от такова индуциране на антиоксидантна защита, каквото се наблюдава при действие само на оксиданта t-ButOON.

Интересно е да се отбележи и установеният, макар и слаб, стимулиращ ефект на етиловия алкохол върху тази експресия. Ефектът на етанола би могъл да се свърже с индуцирана от него продукция на АКФ (Коор, 2006). По не добре проучен механизъм етанолът индуцира активността на метаболизиращия го ензим цитохром P450-2E1 (CYP2E1) и усилва свързаната с това АКФ продукция (Naorah et al., 2005). Други механизми на усилен АКФ синтез под влияние на етанола се свързват с повишаване нивата на свободно желязо, трансформирането при консумация на етанол на ксантин дехидрогеназата в ксантин оксидаза, която може да генерира АКФ, образуване на радикали - деривати на етанола, такива като 1-хидроксиетиллов радикал, изчерпване на нивата на вътреклетъчния глутатион поради протичащата по-интензивна редукцията на окислени от радикалите биомолекули и други (Wu & Cederbaum, 2003). Вероятно именно увеличената продукция на АКФ е и причината и за стимулираната експресия на ензими, свързани със синтезата на глутатион.

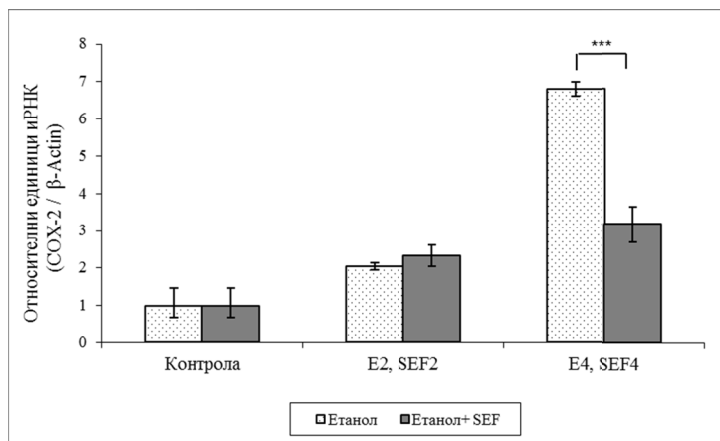
От друга страна, обаче, между индуциращата сила на разтворите на етанол и екстрактите, беше установена значителна разлика в полза на екстракта. Измереното индуциране на транскрипцията на GCL от растителните екстракти може да се обясни с наличието на фенолни съединения в екстракта, които притежават способността да индуцират тази експресия. Myhrstad et al. (2002) описват такава активност например за кверцетин и откриват, че тази индукция е ARE/ErpRE опосредствана. Кверцетин може да

индуцира ARE/ErRE медирана експресия и на други редокс сензитивни гени (Valerio et al., 2001; Yao et al., 2007). Вероятният механизъм, посредством който флавоноидите могат да проявят ARE/ErRE-опосредствано активиране на транскрипцията, е модифициране на взаимодействието между Keap1 и Nrf1 и Nrf2, освобождаване на транскрипционните фактори и транслокацията им в ядрото. Няколко са хипотезите за механизма на това действие. Те се основават на способността на флавоноидите да се свързват с тиолните групи (Galati et al., 2001), с участието им в реакции на автоокисление и образуване на флавоноидни радикали, и вероятна продукция на H₂O₂ и супероксиден анион в тяхно присъствие (Kessler et al., 2003), продукция на H₂O₂ в резултат на техния метаболизъм чрез цитохром P₄₅₀ монооксигеназната система, изчерпване на GSH в реакции на конюгация на полифеноли при метаболизирането им с участието на ензими от фаза II за обезвреждане на ксеноботици (Hong & Mitchell, 2006). Всички тези хипотези се основават на намаление на съотношението GSH:GSSH, последваща промяна в редокс състоянието на ключови тиолови групи и повлияване активността на транскрипционните фактори, регулиращи експресията на GCL.

Докато експресията на GCL в нестимулирани преадипоцити и макрофаги се повлиява положително както от наличието на оксидативен агент, t-ButOOH, така и от съединения, съдържащи се в AE и SE, то претретирането на клетките с растителни екстракти намали стимулиращото действие на оксидативния агент. При преадипоцити, обаче, такова действие имаше и етиловият алкохол, докато при макрофаги това действие може да се отдаде на съдържащи се в растението съставки. Полученият резултат може да бъде обяснен с *in vitro* доказаните антиоксидантни свойства на екстрактите. Най-вероятно при наличие на оксидативен агент антиоксидантите от растителните извлекци преимуществено вземат участие в реакции на обезвреждането му, вследствие на което неговата

стимулиращия ефект на етанол върху експресията на IL-6 и TNF- α цитокините и върху експресията на провъзпалителните ензими COX-2 и iNOS в култивирани 3T3-L1 предипоцити след 24 часово инкубиране с различни концентрации етанол в хранителната среда.

Данните от литературата свидетелстват, че етанолът може да има противовъзпалително действие, като намалява стимулираната от цитокини и бактериални липополизахариди генна експресия на IL-6 и TNF- α (Goral et al., 2005; von Haefen et al., 2011), както и тази на iNOS (Syapin et al., 2001). Но в отсъствие на проинфламаторни стимули той, обратно, индуцира експресията на IL-6 и TNF- α (Yuan et al., 2006, Mandrekar et al., 2011), както и на iNOS (Yuan et al., 2006) и COX-2 (Nanji et al., 1997). Същевременно, съществуват данни и за синергично действие на етанола и проинфламаторни стимули (Gobejishvili et al., 2006). Избраните 0.25% и 0.5% обемни концентрации на етанол съответстват на 42.8mM и 85.6mM етанол, съответно, и са физиологично допустими *in vivo* (Szabo et al., 1996, Davis & Syapin, 2004), а МТТ тестът за цитотоксичност установява постепенно намаляване на жизнеспособността на клетките при избраните концентрации на етанол. Резултатите от настоящото изследване са в съответствие с наличните данни от *in vitro* изследвания на други видове култивирани клетки – макрофаги (Fernandez-Lizarbe et al., 2008), човешки хепатоцелуларни карциномни клетки (Gutiérrez-Ruiz et al., 1999), A431 епидермални клетки и нормални човешки първични кожни клетки от новородени (Neuman et al., 2002), НМС-1 човешки мастни клетки (Jeong et al., 2005). Единични са изследванията, които проучват ефекта на етанола върху адипозна тъкан или (пре)адипоцитни клетъчни линии. *In vivo* експерименти при модел на третиране с етанол на плъхове установяват увеличение на IL-6 и TNF- α в АТ на животните след хроничен прием на етанол (Kang et al., 2007). Наблюдавана е зависима от времето промяна в освобождаването на IL-6 след третиране



Фигура 18. Повлияване на етанол-индуцираната експресия на COX-2 в 3T3-L1 клетки, претретирани с EA фракции от *S. ebulus*

E2 – 0,25 % етанол, E4 – 0,5 % етанол; SEF2 – 0.01% EA фракция от *S. ebulus*; SEF4 – 0.02% EA фракция от *S. ebulus*;

*** $p < 0,001$, понижение в нивата на иРНК, спрямо етаноловата контрола

Обсъждане

Влиянието на етанола върху експресията в адипоцити е слабо изследвано. Установихме, че етанол индуцира експресията на провъзпалителните фактори TNF- α и IL-6, а също така и на ензимите COX-2 и iNOS, участващи във възпалителни реакции. По подобен начин експресията на TNF- α и IL-6 се увеличава в RAW264.7 макрофажна клетъчна култура под действие на етанол и в мастна тъкан на експериментални животни, хронично третирани с етанол (Fernandez-Lizarbe et al., 2008; Kang et al., 2007). В резултат на настоящото проучване се получават данни за ефекта на етанол върху експресията на TNF- α , IL-6, COX-2 и iNOS при преадипоцити. За първи път се установява, че растителни екстракти могат да намалят стимулиращия ефект на етанол върху експресията на тези гени. Настоящото проучване представя за първи път данни за

концентрация и съответно стимулиращият ефект върху транскрипцията на гена за GCL намаляват. Механизмът, по който етанолът намалява стимулиращото действие на оксидативния агент остава неясен. Дори има данни, които сочат, че полифеноли (в частност кверцетин) понижават индуцирания от етанола оксидативен стрес в митохондриите (Tang et al., 2012).

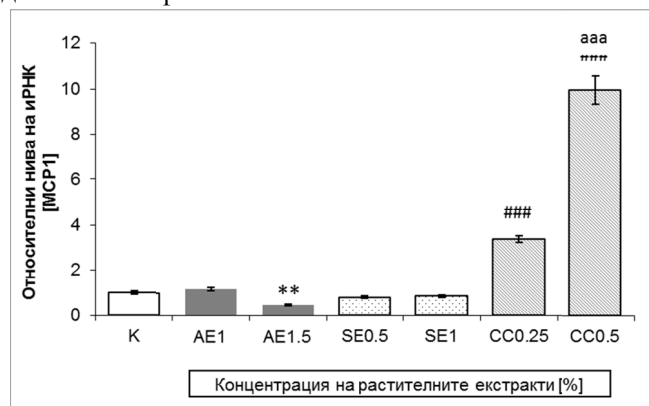
Настоящите експерименти показаха, че АЕ проявява инхибиращо действие върху степента на експресия на GPx4 в нестимулирани J774A.1 макрофаги, като проявеният ефект беше в зависимост от концентрацията на екстракта. В 3T3-L1 преадипоцитна клетъчна култура не беше установено значимо повлияване на експресията на този ензим нито от АЕ, нито от SE. Това може да предполага наличието на специфичност по отношение на отговора на клетките. Ако се допусне, че експресионният контрол на GCL и GPx4 е сходен, то установеното инхибиране на транскрипцията на GPx4 от АЕ е неочаквано. Такъв ефект, обаче, е описан за някои фенолни съединения и други видове антиоксиданти (Röhrdanz et al., 2003; Sneddon et al., 2003). Установеният инхибиращ ефект на АЕ върху експресията на GPx4 може да се обясни по-скоро с антиоксидантни свойства на екстракта. Като обезвреждат АКФ, продуцирани при нормалния метаболизъм на клетките, фенолните съединения намаляват необходимостта от действието на GPx4, в резултат на което се отчита понижение в експресията на този ензим, в сравнение с базовите нива (нетретирания контрол).

Претретирането на 3T3-L1 преадипоцити с АЕ и SE и на J774A.1 макрофаги с АЕ доведе до намаляване на стимулиращия ефект на оксиданта върху експресията на GPx4. При преадипоцити претретирането с АЕ възстановява нивото на транскрипция до базовото. При макрофаги нивата на експресия на GPx4 в претретираните клетки са по-ниски от тези и на нетретирания контрол. Както при нестимулираните клетки, така и в експериментите с претретиране и последваща оксидативно стимулиране с t-ButOОН, би могло да се преположи, че се проявява

антиоксидантна активност на екстракта. Фенолните съединения встъпват в реакции на обезвреждане на оксиданта, а също и на генерирани в негово присъствие АКФ, и с това понижават необходимостта от увеличаване на нивата на GPr4.

Експресия на провъзпалителни фактори при прилагане на индуктор на възпалението

Резултатите от ефекта на *A. eupatoria*, *S. ebulus* и *C. cogygria* върху нивата на иРНК на MCP1 в 3T3-L1 клетки, култивирани в отсъствие на индуктор на възпаление са представени на фиг. 11.

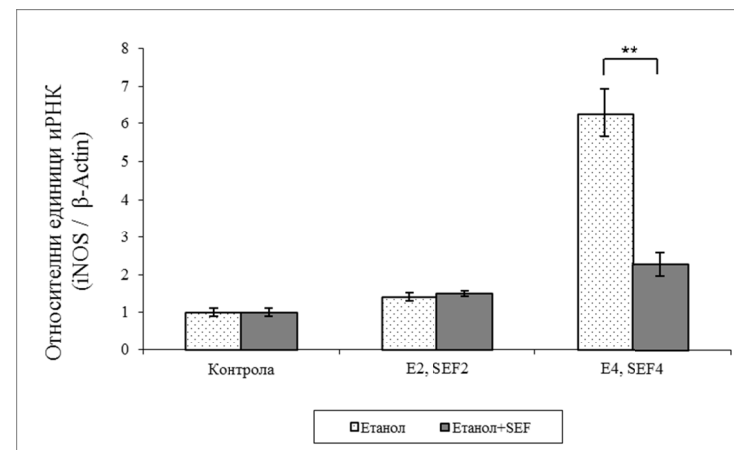


Фигура 11. Експресия на MCP1 в 3T3-L1 клетки, третирани с избрани концентрации на ЕА фракция от изследваните билки: К - контрола (клетки култивирани без индуктор на възпаление), АЕ (*A. eupatoria*), SE (*S. ebulus*), СС (*C. cogygria*); цифровите индекси показват приложената концентрация в проценти.

###p<0,001 увеличение в нивата на иРНК, спрямо контролата; **p<0,01 понижение в нивата на иРНК, спрямо контролата; aaa p<0,001 спрямо другата концентрация на съответния екстракт

Под действие на *A. eupatoria* в по-високата концентрация (0.5%) експресията на MCP-1 е потисната значително,

(p<0.001) и 64% (p<0.01), респективно (фиг. 17-18). Пониската концентрация на фракцията (0,01%) намали значително стимулиращото действие на 0,25% етанол върху експресията на IL-6 с около 71% (p<0.01).



Фигура 17. Повлияване на етанол-индуцираната експресия на iNOS в 3T3-L1 клетки, претретирани с ЕА фракции от *S. ebulus*

E2 – 0,25 % етанол, E4 – 0,5 % етанол; SEF2 – 0.01% ЕА фракция от *S. ebulus*; ; SEF4 – 0.02% ЕА фракция от *S. ebulus*;

**p<0,01, понижение в нивата на иРНК, спрямо етаноловата контрола

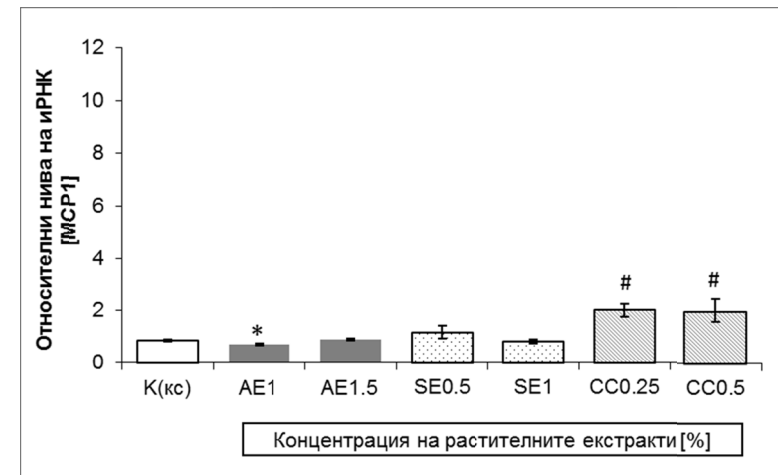
противовъзпалителното действие на *S. ebulus* се дължи на свойството на екстракти и отделни фракции от различни части на растението, както и отделни активни компоненти да потискат активността на IL-1 β и TNF α (Yesilada et al., 1997; Schwaiger et al., 2011). За първи път обаче, в рамките на настоящото изследване, е доказан директен ефект на *S. ebulus* върху IL-6 в модел на индуциран възпалителен отговор на клетъчни култури. Получените от нас данни за камшик в присъствие на индуктор на възпаление са в подкрепа на докладвания от други автори инхибиторен ефект на билката върху IL-6 и други цитокини (Bae et al., 2010), а за първи път с резултатите от настоящото изследване се потвърждава такъв ефект за ЕА фракция.

Проучването на ефекта на ЕА фракции от *A. eupatoria*, *C. coggygia* и *S. ebulus* позволява да се направи заключение, че приложени върху клетки с индуцирано възпаление и трите билки проявяват противовъзпалително действие, инхибирайки експресията на поне два от изследваните цитокини.

Проучване на протективния ефект на ЕА фракция на S. ebulus върху етанол-индуцираната експресия на проинфламаторни цитокини и ензими, свързани с възпалението

По-подробно противовъзпалителното и имуностимулиращо действие на плодове от бъзак е изследвано в условията на етанол-индуцирана експресия на проинфламаторни гени – IL-6, TNF α , iNOS и COX2. При третиране на 3T3-L1 клетки с 0,5% етанол е наблюдавано почти 36-кратно увеличение в експресията на IL-6, сравнено с нетретирания контрол. Нивата на иРНК за TNF- α , iNOS и COX-2 бяха стимулирани от етанола съответно около 4, 6 и 7 пъти. Претретирането на клетките с 0,02% ЕА фракция на *S. ebulus* намали стимулиращия ефект на етанола върху експресията на изследваните гени. Експресията на iNOS, COX-2 и TNF- α беше редуцирана с 63% ($p < 0.01$), 54%

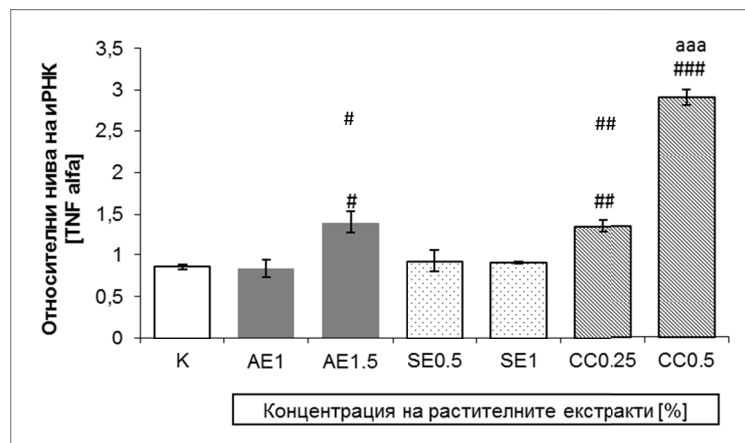
докато претретирането със *S. ebulus* не доведе до промяна в нивата на цитокина. Претретирането с *C. coggygia* стимулира значително експресията на MCP-1, очевидно без да засяга клетъчната жизнестойност, тъй като най-изразен е този ефект под действието на концентрацията, при която екстрактът стимулира клетъчната пролиферация (фиг. 6А). При прилагане на кондиционирана среда като индуктор на възпаление претретиране с ЕА фракция на *A. eupatoria* има отново инхибиращ, а ЕА фракция на *C. coggygia* – стимулиращ ефект върху експресията на MCP-1 (фиг. 12).



Фигура 12. Експресия на MCP1 в 3T3-L1 клетки, третиране с избрани концентрации на ЕА фракция от изследваните билки при използването на индуктор на възпаление кондиционирана среда: К(к) - контрол (клетки в кондиционирана среда), АЕ (*A. eupatoria*), SE (*S. ebulus*), СС (*C. coggygia*); цифровите индекси показват приложената концентрация в %.

$p < 0,05$, увеличение в нивата на иРНК, спрямо контролата; * $p < 0,05$ понижение в нивата на иРНК, спрямо контролата

Ефектите на етилацетатните фракции от тотални екстракти на *A. eupatoria*, *S. ebulus* и *C. coggygia* върху експресията на гена за TNF α са представени на фиг. 13 и 14.



Фигура 13. Експресия на TNF α в 3T3-L1 клетки, третирани с избрани концентрации на ЕА фракция от изследваните билки: К - контрола (клетки култивирани без индуктор на възпаление), АЕ (*A. eupatoria*), SE (*S. ebulus*), СС (*C. coggygia*); цифровите индекси показват приложената концентрация в проценти.

#p<0,05, ###p<0,001 увеличение в нивата на иРНК, спрямо контролата; **p<0,01 понижение в нивата на иРНК, спрямо контролата; aaa#p<0,001, спрямо другата концентрация на съответния екстракт

В присъствие на индуктор на възпалението (фиг. 14) и трите билки оказват инхибиращ ефект върху генната експресия, като при *C. coggygia* този ефект се наблюдава при претретирание с екстракт в по-ниската концентрация, докато третирането с 0.25% съдържание на ЕА фракция в културалната среда стимулира експресията.

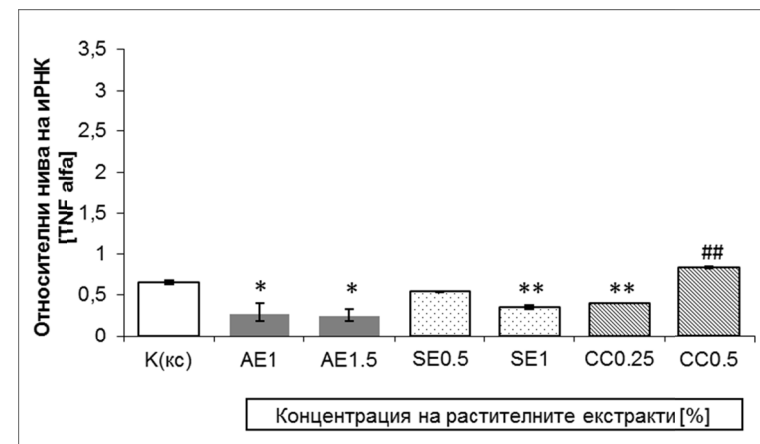
адипоцитите, като потиска експресията на ключови за тях гени, какъвто е този на GLUT-4. Нивата му в плазмата корелират положително със степента на затлъстяване и на базата на директното му участие в прекъсване на инсулиновата сигнализация, TNF- α може да се смята за свързващо звено между затлъстяването и риска от развитие на инсулинова резистентност (Moller, 2000; Borst 2004; Bastard et al., 2006). По наблюденията ефект на трите билки върху експресията на цитокина може да се твърди, че в условията на иницииран възпалителен процес всички те имат противовъзпалителен ефект, въпреки че е установен успоредно с това и капацитет за активиране на проинфламаторни цитокини в отсъствие на възпалителен стимул. Наблюденият ефект на смрадликата върху TNF α е подобен на този, описан за MCP-1, и би могъл да обяснява имуномодулаторните свойства на *C. coggygia*, а добре изразената концентрационна зависимост на ефекта вероятно отразява по-сложен механизъм на действие. Инхибиращият ефект на фракциите от тези растения върху TNF α в условията на индуцирано възпаление не е изненадващ, предвид установеното високо съдържание на полифеноли в ЕА им фракции. Такъв ефект на полифенолите върху проинфламаторните цитокини, включително върху TNF α , е докладван от много автори (Crouvezie et al., 2001; Comalada et al., 2006; Chuang et al., 2010; Yen et al., 2011).

IL-6 се секретира от много типове клетки, включително и от адипоцитите и е важен проинфламаторен фактор в острата фаза на възпалителния процес. Заедно с TNF α бива считан за предиктивен маркер за диабет тип 2 от гледна точка на наличните данни за участието му в патогенезата на асоциираната със затлъстяване инсулинова резистентност (Bastard et al., 2000; Kern et al., 2001; Vozarova et al., 2001; Yuen et al., 2009).

Получените резултати за ефекта на растителните фракции демонстрират стимулиращ ефект на *A. eupatoria*, *C. coggygia* и инхибиращ за *S. ebulus* в отсъствие на проинфламаторен стимул. Научните данни сочат, че

eupatoria има също инхибиращ, а ЕА фракция на *C. coggygia* – стимулиращ ефект върху експресията на MCP-1, като стимулиращият ефект на *C. coggygia* върху нивата на MCP-1 е значително по-слаб в присъствие на индуктор на възпалението. Такъв капацитет за активиране на проинфламаторни цитокини като при смрадликата е описан за много растителни препарати, традиционно прилагани като имуностимулатори (El-Obeid et al., 2006; Rininger et al., 2000). Някои автори докладват, че екстракти, фракции или отделни биологично активни компоненти на лечебни растения са доказани имуномодулатори, като за някои от тях е показано, че в здрава имунна система повишават базисните нива на цитокините, докато при индуциран процес на възпаление потискат тяхната активност (Kim et al., 1998; Hsu et al., 2004; Spelman et al., 2006; Sullivan et al., 2008; Ghildyal et al., 2010). Резултатите от изследването не могат да дадат отговор на въпроса на какво се дължи този имуномодулиращ ефект на ЕА фракция на *C. coggygia*. Необходимо е да се проучи до колко играе роля високата концентрация на полифеноли и какви са другите компоненти, концентрирани в изследваната фракция. Бъдещи проучвания биха могли да изследват ефекта на *C. coggygia* също и върху активността на ензими, участващи в медирането на възпалителния процес, каквито са индуцируемите форми на циклооксигеназата (COX2) и азотноокисната синтаза (iNOS). Вероятно *C. coggygia* има известен инхибиращ ефект върху тяхната активност в условията на индуцирано възпаление. Ако този ефект на билката се докаже, може да се предполага, че механизмът, чрез който той се осъществява, оказва влияние върху сигналния път, контролиращ експресията на MCP-1.

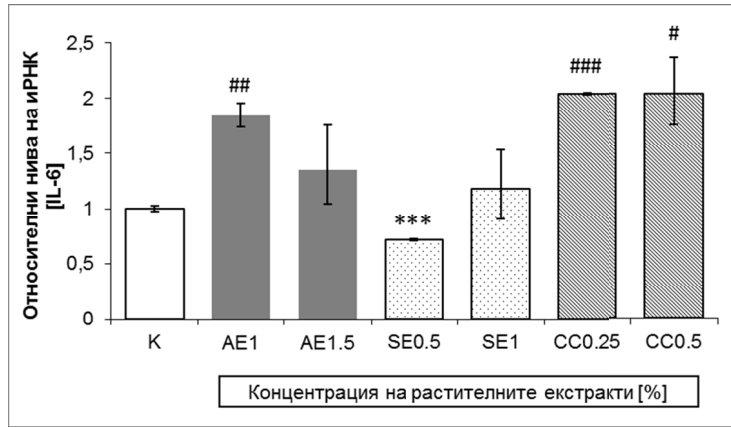
Тумор-некротизиращ фактор алфа (TNF α) е мощен проинфламаторен цитокин, участващ в патогенезата на много хронични заболявания (Bradley, 2008; Dandona et al., 2004). Освен че е един от основните фактори, поддържащи нискостепенното възпаление при затлъстяване, допуска се, че има и негативни ефекти върху метаболизма на



Фигура 14. Експресия на TNF α в 3T3-L1 клетки, третирани с избрани концентрации на ЕА фракция от изследваните билки при използването на индуктор на възпаление кондиционирана среда: К - контрола (клетки в кондиционирана среда), АЕ (*A. eupatoria*), SE (*S. ebulus*), СС (*C. coggygia*); цифровите индекси показват приложената концентрация в проценти.

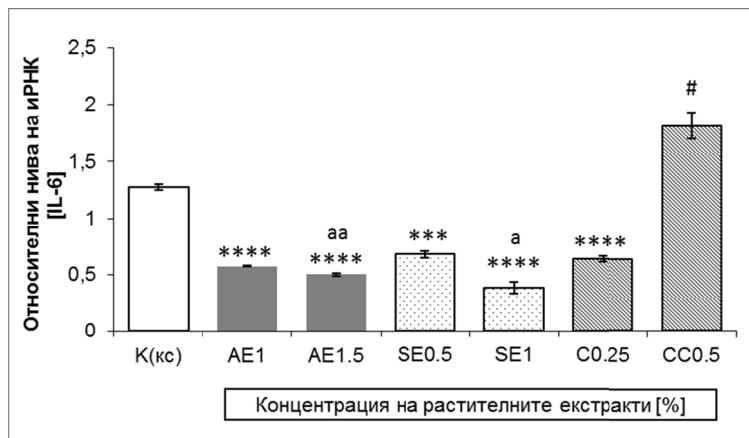
##p<0,01 увеличение в нивата на иРНК, спрямо контролата; *p<0,05, **p<0,01 понижение в нивата на иРНК, спрямо контролата

Ефектите на етилацетатните фракции от тотални екстракти на *A. eupatoria*, *S. ebulus* и *C. coggygia* върху експресията на гена за IL-6 са представени на фиг. 15 и 16.



Фигура 15. Експресия на IL-6 в 3Т3-Л1 клетки, третирани с избрани концентрации на ЕА фракция от изследваните билки: К-контрола (клетки култивирани без индуктор на възпаление), АЕ (*A. eupatoria*), SE (*S. ebulus*), СС (*C. coggugria*); цифровите индекси показват приложената концентрация в проценти.

#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 увеличение в нивата на иРНК, спрямо контролата; ***p<0.001 понижение в нивата на иРНК, спрямо контролата



Фигура 16. Експресия на IL-6 в 3Т3-Л1 клетки, третирани с избрани концентрации на ЕА фракция от изследваните билки: К(кс)-контрола (клетки в кондиционирана среда), АЕ (*A. eupatoria*), SE (*S. ebulus*), СС (*C. coggugria*); цифровите индекси показват приложената концентрация в проценти.

#p<0.05 увеличение в нивата на иРНК, спрямо контролата; ***p<0.001, ****p<0.0001 понижение в нивата на иРНК, спрямо контролата; #p<0.05, aa p<0.01, спрямо другата концентрация на съответния екстракт

За разлика от *S. ebulus*, който приложен самостоятелно върху 3Т3-Л1 клетки в отсъствие на индуктор на възпаление инхибира експресията на IL-6, фракциите от *A. eupatoria* и *C. coggugria* в същите условия имат стимулиращ ефект върху нивата на иРНК на цитокина IL-6 (фиг. 15). При клетки, третирани с кондиционирана среда, ЕА фракции от камшик и бязак имат значителен инхибиращ ефект, който е концентрационно зависим. Само ниската концентрация на смрадлика инхибира експресията на цитокина, докато високата, както и при другите два цитокина, има стимулиращ ефект.

Обсъждане

Провъзпалителният хемокин моноцит-хемотаксичен протеин 1 (MCP1) е фактор, тригериращ миграцията на моноцитите към местата на възпаление (Linton and Fazio, 2003). Негови мощни индуктори са TNF α и IL-1 β (Fain and Madan, 2005). Участва в реакции на възпаление, но и в увеличаването на мастната тъкан и нейното ремоделиране и ангиогенезата (Dahlman et al., 2005, Weisberg et al., 2006). MCP-1 се продуцира от различни типове клетки, в т.ч. и от адипоцити (Rollins, 1997). Докладвано е, че в експериментални модели на затлъстяване и метаболитни нарушения нивата му в плазмата са значително повишени (Sartipy and Loskutoff, 2003; Takahashi et al., 2003). Повлияване на неговата продукция би могло да е свързано с противовъзпалителния ефект на някои билкови извлекци и екстракти.

И действително, под действие на ЕА фракция от камшик, експресията на MCP-1 е потисната значително (фиг. 12). Други изследвани растения нямат, обаче такъв ефект, като изследвания в паралел бязак. А някои (смрадлика в по-високата концентрация) имат дори стимулиращо експресията на MCP-1 гена действие. В присъствие на индуктор на възпаление, претретирани с ЕА фракция на *A.*