

СУ „Св. Климент Охридски“  
Биологически факултет  
Катедра „Клетъчна биология и биология на развитието“

СОФИЙСКИ  
УНИВЕРСИТЕТ



„СВ. КЛИМЕНТ  
ОХРИДСКИ“  
ОСНОВАН 1888 г.

Ас. Ралица Крумчева Велева

**Изследване на екстракти от български растения за  
приложение в медицината**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд  
за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ по професионално  
направление 4.3 Биологически науки (Клетъчна биология)

**Научен ръководител:**  
Доц. д-р Тая Топузова-Христова

**Научен консултант:**  
Проф. д-р Галя Станева

София, 2022

### **Благодарности:**

Бих искала да изкажа благодарността си към научния си ръководител доц. Таня Топузова-Христова за подкрепата и напътствията, благодарение на които тази дисертация беше осъществена, за споделения опит и знанията, които продължавам да получавам. Изказвам благодарност и към научният си консултант, проф. Галя Станева за това, че ме въведе в своята научна област и за топлото отношение.

Благодаря и на целия екип на катедра “Клетъчна биология и биология на развитието” на БФ при СУ “Св. Климент Охридски” за приемането, съдействието и насърчаването.

## **УВОД**

Съвременна тенденция във фармакологията е проучването на вещества с растителен произход и употребата на природни биоактивни молекули или техни производни като прекурсори. Природните продукти имат незаменима роля като източници на активни съставки за нови лекарствени средства. Човешкият организъм притежава развити механизми за метаболизиране на растителни субстрати, което прави препаратите на растителна основа по-лесни за усвояване и в повечето случаи предпочитани пред синтетичните препарати. Множествената лекарствена резистентност е съществен проблем, възникващ при лечението на онкологични заболявания. Според някои автори едно от възможните решения за този проблем могат да бъдат различни синтезирани в природата вещества [1]. Медицинските растения, намиращи приложение в традиционната медицина, са най-често срещаният обект на разширени проучвания, тъй като те са с доказано благоприятно въздействие върху организма. Лечебният ефект на тези растения се приписва на съдържащите се в тях вторични метаболити. В България са известни около 3600 вида растения, от които около 650 представляват лечебни растения. Благодарение на разнообразните климатични и почвени условия растенията на територията на България съдържат висок процент биологично активни вещества [2]. Изследванията, включени в настоящата дисертация имат за цел да разкрият биологичната активност на растителни екстракти от различни български видове с медицинско значение. Интересът ни беше насочен към действието на отделни биологично активни вещества и екстракти, обогатени с определени групи биологично активни вещества (БАВ).

### **Цели и задачи**

Целта на дисертационния труд е, чрез изследване на биологичната активност на екстракти от растения от род *Inula* и *Lamium* по отношение на селективна цитотоксичност към ракови клетки, промени в мембранната организация и клетъчната морфология да бъдат определени тези от тях, които са най-перспективни за последващи изследвания и бъдещо приложение в медицината.

За осъществяване на тази цел си поставихме следните задачи:

- Да бъде изследвана цитотоксичността на растителните екстракти върху различни клетъчни линии с туморен и нетуморен произход и да бъдат анализирани промените в морфологията на клетките, предизвикани от екстрактите.

- Да бъде установена активността на екстрактите върху интегритета и подредеността на клетъчни мембрани. Да визуализираме подредеността на липидите в клетъчната мембрана чрез подходяща флуоресцентна сонда, след което да околнествим получените резултати.

- Да бъде оценено действието на екстрактите върху актиновия цитоскелет.

- Да бъде определена степента на увреждане на ДНК на ракова и неракова клетъчна линия след третиране с екстрактите.

- Чрез спектрофотометрични методи да бъде установен антиоксидантния капацитет на екстрактите и тяхното влияние върху подредеността на липидния бислой в моделни мембранни системи.

## **Материали и методи**

Като *in vitro* моделна система използвахме следните клетъчни линии:

- Клетъчна линия A549.

Ракова алвеоларна епителна линия, модел на пневмоцити тип II.

- Клетъчна линия HepG2.

Епителна клетъчна линия с произход от хепатоцелуларен карцином.

- Клетъчни линии HSF и HFF.

Клетъчни линии от човешки фибробласти.

- Клетъчна линия MDCK II.

Клетъчна линия, изолирана от бъбречен епител на куче.

- Клетъчна линия RPE-1.

Клетъчна линия с произход от ретинален пигментен епител.

Активността на екстрактите беше анализирана посредством следните методи:

1. Определяне на цитотоксичността на екстрактите и промените в морфологията на клетките чрез оцветяване с кристал виолет.

2. Изследване на пермеабилитета на плазмената мембрана чрез тест с трипаново синьо.

3. Изследване на промените в актиновия цитоскелет на клетки A549 и MDCK след третиране с растителни екстракти посредством оцветяване с TRITC (tetramethylrhodamineisothiocyanate) фалоидин.

4. Оценка на генотоксичността на екстрактите върху ракова и неракова клетъчна линия с помощта на кометен тест.

5. Флуоресцентни методи за изследване на промените в подредеността на липидите в клетъчни мембрани, предизвикани от екстрактите.

- Спектрофотометрично изследване на клетки, белязани с Лаурдан
- Флуоресцентна микроскопия на клетъчни мембрани, белязани с Лаурдан
- Флуоресцентна микроскопия на клетъчни мембрани, белязани с di-4-ANEPPDHQ

6. Флуоресцентни методи за изследване на промените в подредеността на липидите в моделни мембранни системи, предизвикани от екстрактите

- Лаурдан флуоресцентна спектроскопия
- TEMPO-DPH флуоресцентна спектроскопия (методът на гасенето на DPH от TEMPO)
- DPH - флуоресцентна поляризационна спектроскопия

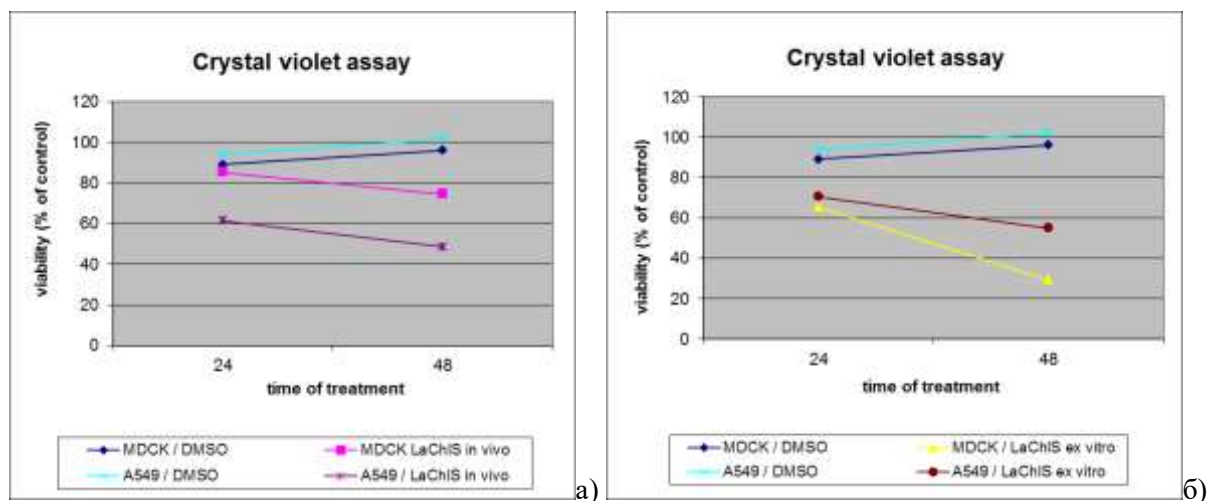
## Резултати и дискусия

### 1. Изследване на биологичната активност на *Lamium album* L.

- **Изследване с кристал-виолет.**

Цитотоксичността на хлороформени екстракти от *in vivo* и *ex vitro* растения с концентрация от 1mg/ml и време за третиране 24ч. и 48ч., беше изследвана чрез оцветяване с кристал виолет. Избрахме тези екстракти и концентрация като най-подходящи въз основа на предшестващите резултати. Тъй като напълно изсушените екстракти бяха разтваряни в хранителната среда с междинен разтворител DMSO, използвахме като контрол за ефект на разтворителя най-високата му крайна концентрация при разтваряне. При контролите и при двете линии наблюдавахме намаляване на отчетения сигнал от интензитета на оцветяване с по-малко от 10% на 24-ти час след третирането, което се компенсираше на 48 час (Фиг. 1.). При третиране с растителните екстракти наблюдавахме трайни увреждания на клетките, които се

засилваха с времето и бяха по-значителни при раковите клетки. Екстрактът от *in vivo* растения не прояви значителна цитотоксична активност върху нераковата клетъчна линия. Изненадващо *ex vitro* екстрактите се оказаха по-токсични за нераковите клетки при продължително въздействие, което показва промяна в състава на вторичните метаболити при адаптиране на растенията от *in vitro* към *in vivo* условия.

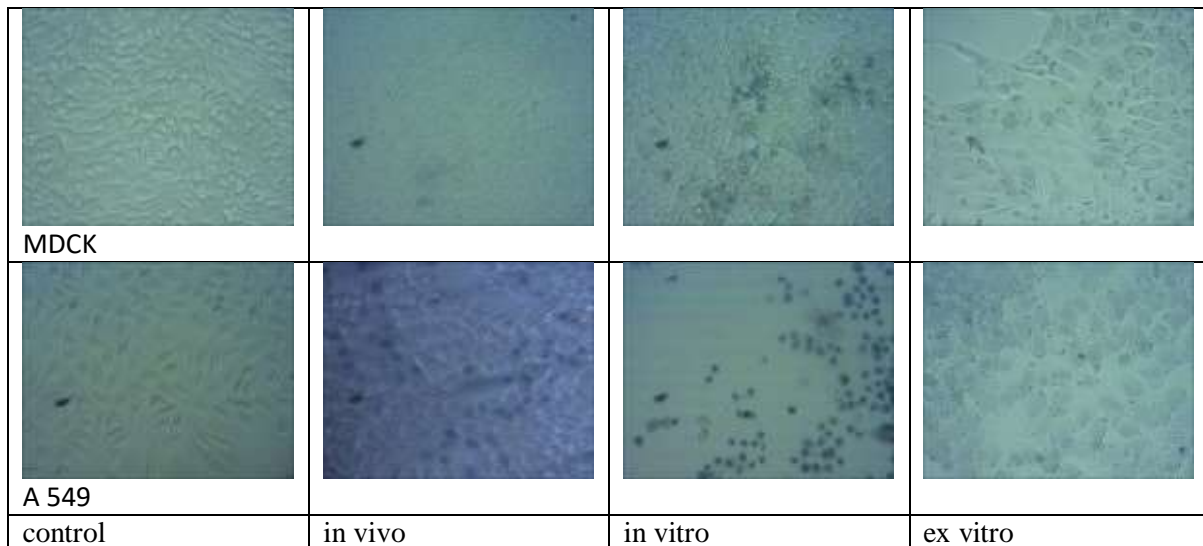


Фиг. 1. Изследване с кристал виолет. а) Клетки, третирани с LaChIS *in vivo*; б) Клетки, третирани с LaChIS *ex vitro*.

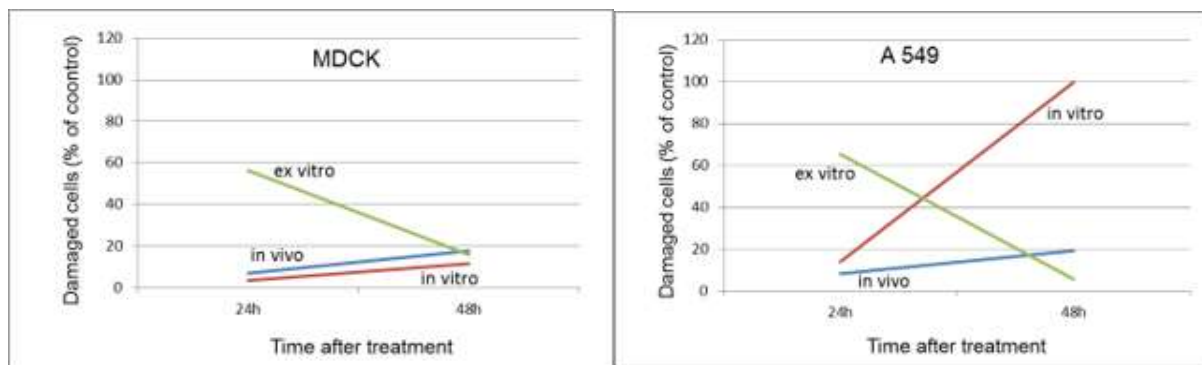
- Изследване за пермеабилитета на клетъчната мембрана.

Повишената неселективна цитотоксичност би могла да се дължи на трайно увреждане на клетъчните мембрани. За да проверим тази хипотеза, изследвахме мембрания пермеабилитет чрез тест за изключване на трипаново синьо (Trypan blue exclusion assay). Експериментите показаха, че *ex vitro* екстракта предизвиква значително увреждане на мембраните и на двете клетъчни линии. След 24-часово третиране отчетохме увреждане на мембраните при повече от половината клетки и при двете клетъчни линии (около 56% за MDCK и ~65% за A549, съответно). На 48ч. процента на клетките с увредени мембрани е сравнително нисък (~16% за MDCK и ~6% за A549, виж Фиг. 2.), но и общият брой клетки е значително редуциран. Вероятно преживелите клетки претърпяват адаптация към действието на екстракта. Тези резултати са в съгласие с изследването за цитотоксичност (с кристал виолет, Фиг. 1.), което отчита общото белтъчно съдържание в пробата и с което ние отчетохме нисък процент преживяемост - повечето от клетките с увредени мембрани, които наблюдавахме през първия ден, явно на 48ч вече са отмрели и не са отчетени.

Екстракта *in vivo* прояви значително по-слабо въздействие върху мембраните и при двете клетъчни линии (по-малко от 20% клетки с нарушен интегритет на мембраната), докато екстрактите от *in vitro* култивираните растения показаха съществена разлика в начина, по който повлияват мембраните на раковите и на нераковите клетки. За MDCK клетките с увредени мембрани бяха ~ 10%, докато за A549 - близо 100% (Фиг. 2.).



Фиг. 2. а)



Фиг. 2. б)

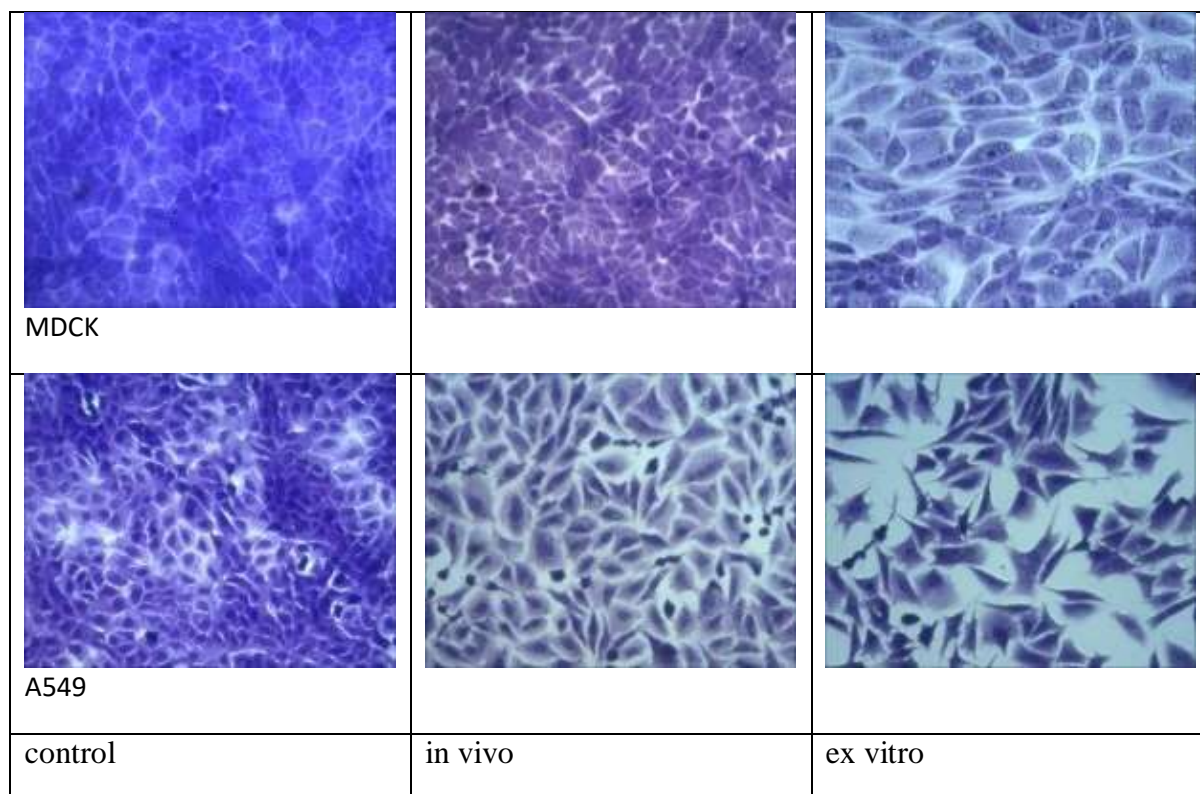
Фиг. 2. Изследване за пермеабилитета на клетъчната мембрана: а) Микрофотографии на контролни и третиранни клетки, оцветени с трипаново синьо. Увеличение 400x; б) Околичествени данни за съответните клетъчни линии.

- Анализ на клетъчната морфология

Морфологията и на двете клетъчни линии, които използвахме е епителна. Нетретираните клетки MDCK оформят плътен монослой, което се дължи на наличието на множество адхезивни и плътни контакти, които са специфични за тях [3]. Монослоят

от третираните клетки MDCK изглеждаше по-рехав, с тънка ивица пространство между клетките. Морфологията им беше по-значително нарушена след приложение на екстракт *ex vitro*. Измененията включваха множество големи везикули сред по-светла, прозрачна и изпълнена с гранули цитоплазма. Наблюдавахме много по-умерени промени в морфологията след третиране с *in vivo* екстракта. Клетъчният монослой запази своята конfluентност, но с по-широки междуклетъчни пространства. Тези резултати са в съответствие със сравнително по-ниската цитотоксичност на екстракта, която наблюдавахме при изследването с кристал-виолет. Наблюдаваните морфологични промени ставаха по-интензивни с времето (фиг. 3.).

Морфологията на раковите клетки беше по-засегната след третиранията, в сравнение с нераковите. Третирането с екстракт *ex vitro* доведе до формиране на дълги и тънки цитоплазмени израстъци при A549. Наблюдавахме се гранулирана цитоплазма, издължени клетки и клетки с намалени размери. Екстрактите, получени от растения *in vivo* предизвикаха значително по-малко изменения в морфологията, като най-често се наблюдаваше гранулирана цитоплазма (фиг. 3.).



Фиг. 3. Морфологични промени в клетки MDCK и A549, предизвикани от LaChIS *in vivo* и *ex vitro* екстракти. Оцветяване с кристал виолет. Увеличение 400x.



Условията на външната среда влияят върху първичния метаболизъм на растенията и стават причина за съответно изменение в състава на вторичните метаболити. При сравнителен анализ на първичните и вторичните метаболити в напълно развити листа от бяла мъртва коприва, получени от *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* растения от колектив на катедрата по Физиология на растенията в БФ [4] е показано, че екстрактите от *in vitro* растенията имат ниско съдържание на феноли и флавоноиди и намалена активност за обезвреждане на свободни радикали [5]. Хлороформеният *ex vitro* екстракт в частност има особено ниско фенолно съдържание. Фенолните съединения имат силно антиоксидантно действие и благоприятен защитен ефект върху клетките. Намаленото количество на фенолни компоненти в *ex vitro* екстрактът би могло да бъде причината за установената от нас по-голяма токсичност към MDCK клетките.

Хлороформената фракция от *in vitro* култивирани растения увреждат предимно мембраните на раковите клетки. Този изразен ефект спрямо туморните клетки в нашите изследвания е възможно да се дължи на наличието на ферулова и синапена киселина, които имат доказани противоракови свойства [6 - 9]. Количеството на ферулова киселина е два пъти по-малко в *in vivo* екстракта, а в състава на *ex vitro* екстракта изобщо не присъства. Някои вещества с противоракова активност, като ситостерол ацетат и сквален [10, 11], са открити само в екстрактита, получен от отглежданите в лабораторни условия растения (*in vitro*). Друго вещество с антитуморни свойства, което преобладава в този екстракт е  $\alpha$ -токоферол [11, 12].

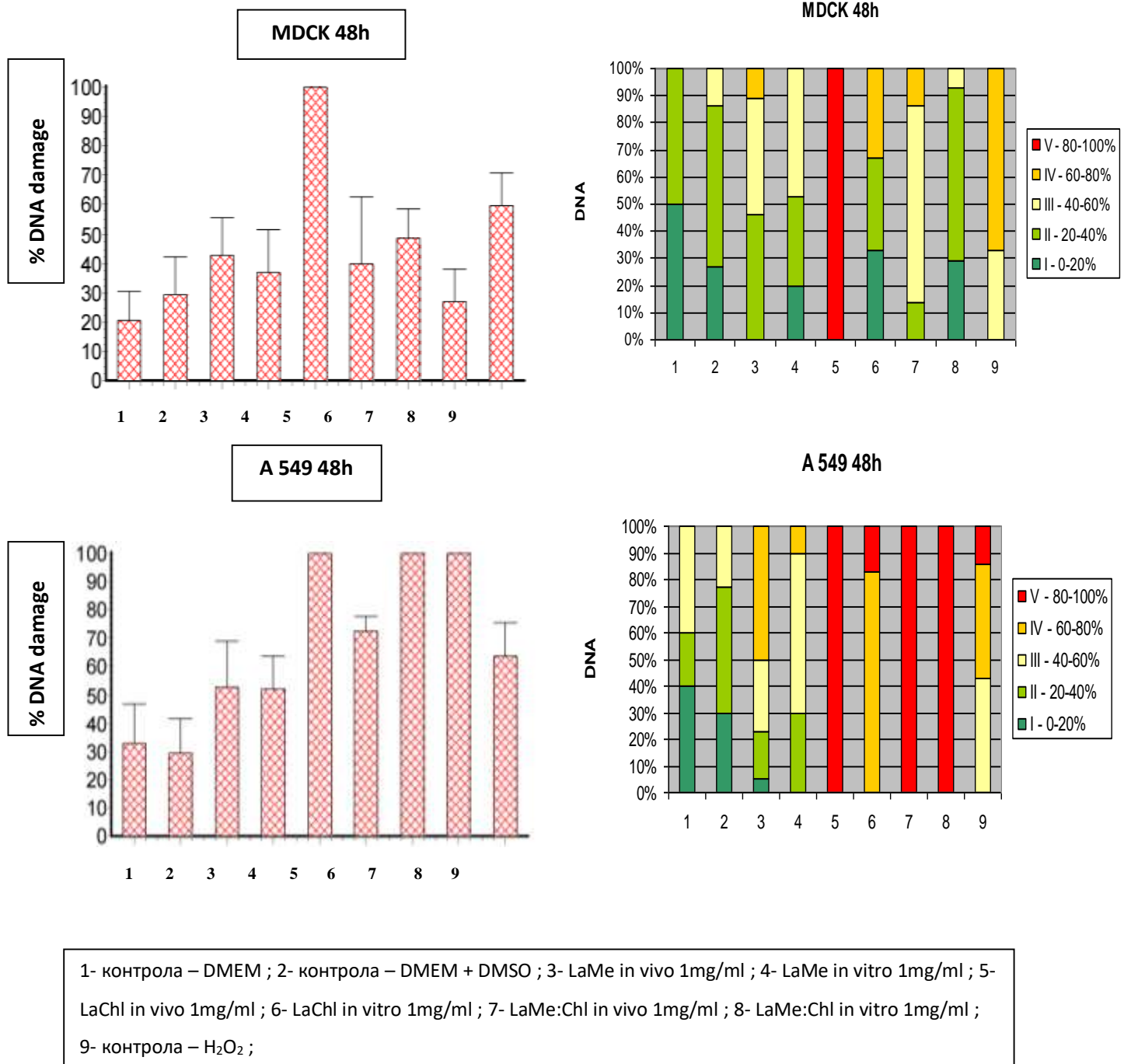
За оцеляването на еукариотната клетка е от съществено значение да възстановява бързо плазмената си мембрана след наранявания и възникнали дефекти. Поправянето на дефекта е зависимо от наличието на  $\text{Ca}^{2+}$  и включва процеси като екзоцитоза, последвана от масова ендоцитоза в увредения участък [13]. Ендоцитозата на увредените части от мембраната се последва от вътреклетъчното им разграждане. Изследването и охарактеризирането на ендозоми, индуцирани в резултат от увреждането на плазмената мембрана, разкрива участието на кавеолите (инвагинации на плазмената мембрана, обогатени със сфинголипиди, които интернализират порите, предизвикани от токсини и се откриват в изобилие в клетките, подложени на механични натоварвания [14]. След приложение на *ex vitro* екстрактът в нашите резултати наблюдавахме много везикули в клетките и висок процент клетки с увредени мембрани. На втория ден от третирането везикулите бяха още по-многобройни, но процентът на увредени клетки намаля значително. Това ни дава основание да

предполагаме, че е възможно клетките да възстановяват мембраните по вече описания начин.

Предходни наши изследвания показаха различно действие на *in vitro* и *in vivo* метанолови екстракти върху ракови (A549, HeLa) и неракови клетки (MDCK, ембрионални Р-клетки). Наблюдавахме най-голям ефект върху раковите клетки след третиране с хлороформен *in vitro* екстракт. След аклиматизиране на растенията извън лабораторни условия *ex vitro* екстракта не прояви значима разлика в ефекта върху ракови и неракови клетки и като цяло ефектът беше неблагоприятен за епителни клетки, което определя тези екстракти като неприемливи за вътрешна употреба. Някои от екстрактите имат потенциал за включване в медицински препарати, но са необходими допълнителни изследвания за прецизиране на тяхното селективно действие към туморни клетки с различен произход (меланом и карциноми, например).

- Изследване за генотоксичност.

Проведохме изследване на генотоксичността на екстрактите чрез кометен тест (single cell gel electrophoresis assay). Резултатите за ДНК увреждането след третиране с екстрактите от *Lamium album* L. са представени като процент увреждане на ДНК. Той е изчислен на базата на съотношението на флуоресценция в т. нар. „опашка“ на кометата спрямо общата флуоресценция в изследваното ядро (цяла комета). Получените проценти за всяко ядро са разпределени в 5 групи по увреждане от 0 до 100%, както следва: I – неувредени (от 0 до 20%), II – слабо увреждане (от 20 до 40%); III средно увреждане (от 40 до 60%), IV – силно увреждане (от 60 до 80%) и V – много силно увреждане (от 80 до 100%). За по-голяма яснота, в графиките първите две групи са означени със зелен цвят, а групите със средно до много силно увреждане са означени със жълт, оранжев и червен цвят (фиг. 4.).



Фиг. 4. Увреждане на ДНК в клетки от линията MDCK и A549 на 48-ми час след третиране с екстракти от *Lamium album* L. в концентрация 1mg/ml.

Като цяло MDCK клетките бяха по-слабо увредени в сравнение с A549, като се наблюдаваше силно увреждане само след третиране с хлороформения *in vivo* екстракт. ДНК на клетъчна линия A549 също беше силно засегната от този екстракт, но в допълнение към това значително увреждане предизвикаха и двете комбинации от екстракти (*in vivo* и *in vitro*). След третиране на MDCK клетките с метаноловият *in vitro*

екстракт наблюдавахме слабо увеличаване на процента на увреждане на ДНК. То е съпоставимо с увеличаването на броя на клетките с фрагментирани ядра, което установихме чрез FACS анализ при същите условия.

Наличието на генотоксичност върху нераковите клетки е сигнал за потенциален риск при приемането му като медикамент за вътрешна употреба. Това ни накара да потърсим други български растения, използвани в народната медицина, които да изследваме за потенциални медицински ефекти. Един от родовете растения с голям потенциал, доказан в редица изследвания е род *Inula*, към който принадлежат Бял оман (*Inula helenium*), Британски оман и други.

## 2. Изследване на биологичната активност на растения от род Инула

### 2.1. Цитотоксичност и морфология

Тестваните екстракти бяха извлечени с хлороформ или метанол, подбрани от различни български видове Инула, от различни части на растението. Цитотоксичните ефекти бяха изследвани върху стабилни клетъчни линии с нераков и раков произход. Третирането на клетките беше провеждано в продължение на 48 часа. Концентрациите, избрани за експериментите са в диапазона от 10 до 300 µg/ml.

#### 2.1.1. Метанолови екстракти

Изследвахме за цитотоксичност метанолови екстракти от шест вида Инула (табл. 1.), растящи в България: *Inula oculus-christi*, *I. bifrons*, *I. aschersoniana*, *I. ensifolia*, *I. conyza* и *I. germanica*. Резултатите от изследването са представени на фиг. 5.

Вид	Метанолови екстракти
<i>I. oculus-christi</i>	ВГ – 2/6; 2/8
<i>I. germanica</i>	ВГ- 5/8
<i>I. bifrons</i>	ВГ-5/4; 5/2
<i>I. aschersoniana</i>	ВГ-2/4
<i>I. conyza</i>	ВГ-1/6; 1/8
<i>I. ensifolia</i>	ВГ- 1/10; 2/2

Табл. 1. Метанолови екстракти от различни български видове от род Инула.

– *I. aschersoniana*. След третиране с 300 µg/ml от екстракт ВГ – 2/4 на първия ден преживяемостта беше близка до 50% и за двете клетъчни линии. На втория ден стойностите за клетки MDCK се покачиха до около 75% от контролата, докато за A549 останаха около 50% до края на експеримента.

– *I. oculus-christi*. След третиране с екстракт ВГ – 2/8 в концентрация от 300 µg/ml беше достигната IC<sub>50</sub> за клетки A549 на 24ч. По-висока цитотоксичност към раковите клетки се наблюдаваше при всички третираня с екстракта по време на целия експеримент. На втория ден при най-ниската концентрация на екстракта (10 µg/ml) отчетохме с 20% по-силна активност спрямо клетки A549. IC<sub>50</sub> и за двете клетъчни линии беше достигната при концентрация от 250 µg/ml.

Активността на екстракт ВГ – 2/6 към раковите клетки достигна IC<sub>50</sub> на 48ч. при третиране с 300 µg/ml, докато преживяемостта на MDCK беше около 75%.

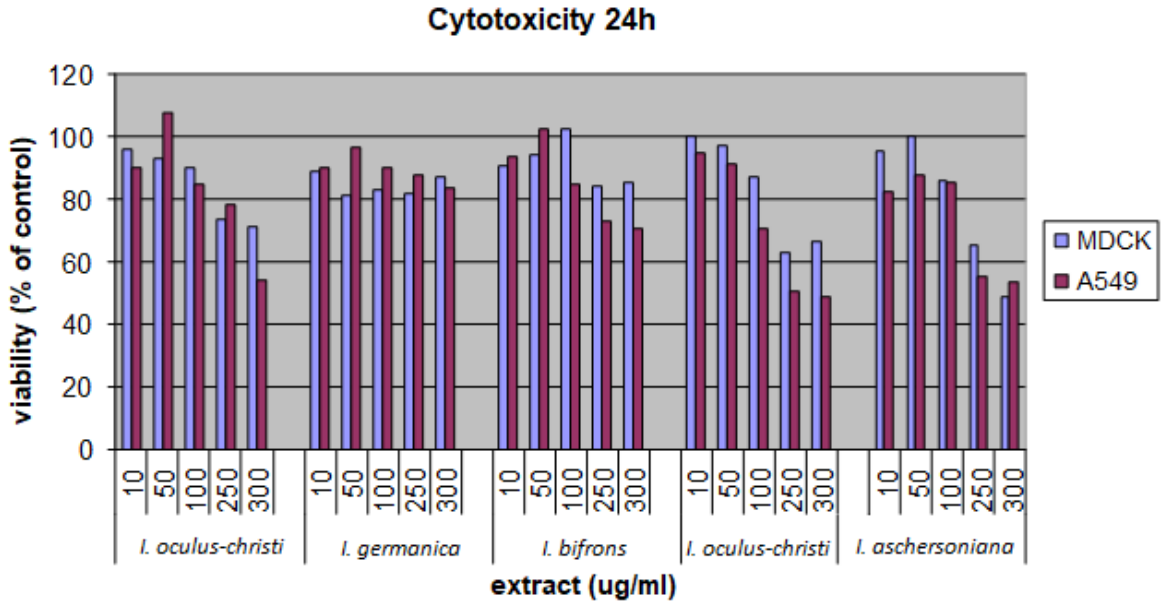
– *I. bifrons*. Екстракт ВГ – 5/4 също повлия по-силно преживяемостта на малигнените клетки, но дори при третиране с най-високата концентрация, използвана в експеримента (300 µg/ml), тя остана малко по-висока от 60%.

– *I. ensifolia*. Активността на екстракт ВГ – 2/2 на 24ч. от третиране с 300 µg/ml достигна IC<sub>50</sub> за клетки A549 и беше малко по-слаба за клетки MDCK. На 48ч. преживяемостта беше малко под 60% за раковите, а за нераковите – около 80%.

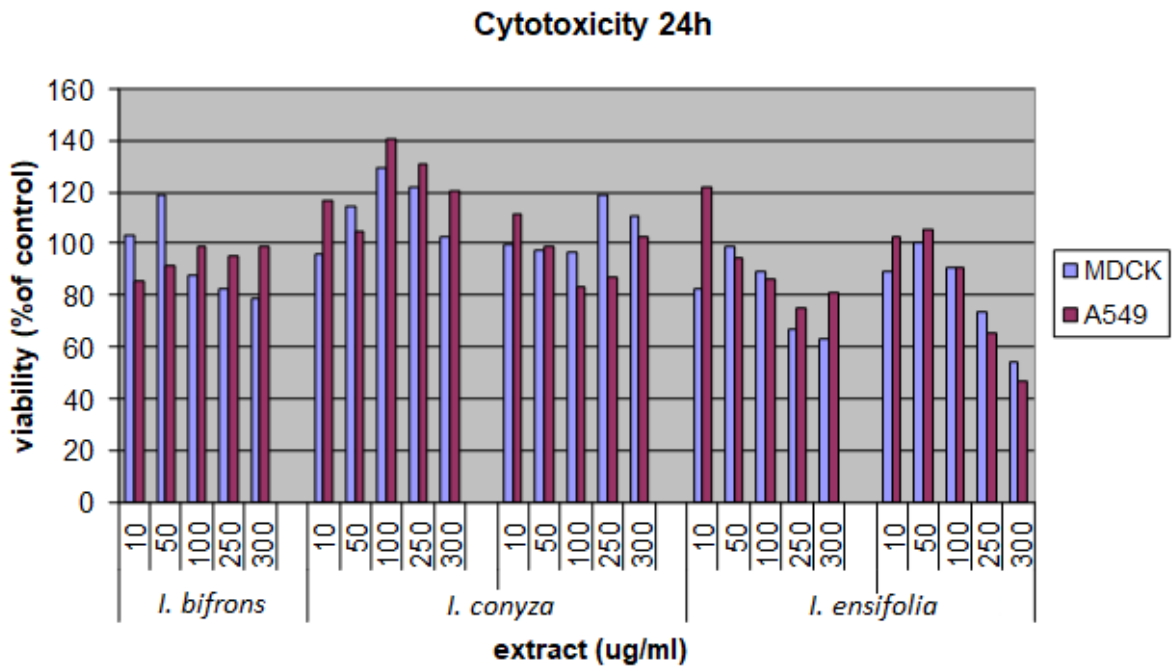
Екстракт ВГ – 1/10 повлия пролиферативно на раковите клетки и слабо потисна нераковите 24ч. след третиране с най-ниската концентрация. При третиране с най-високата – жизнеспособните клетки A549 спадат до 80%, а MDCK са около 20% по-малко от тях. На 48ч. екстрактът въздейства пролиферативно на карциномните клетки в диапазона от 10 до 100 µg/ml.

– След третиране с екстракти ВГ – 1/8 (*I. conyza*), 5/2 (*I. bifrons*) и 5/8 (*I. germanica*) преживяемостта и за двете клетъчни линии при всички концентрации остана близка до 100%.

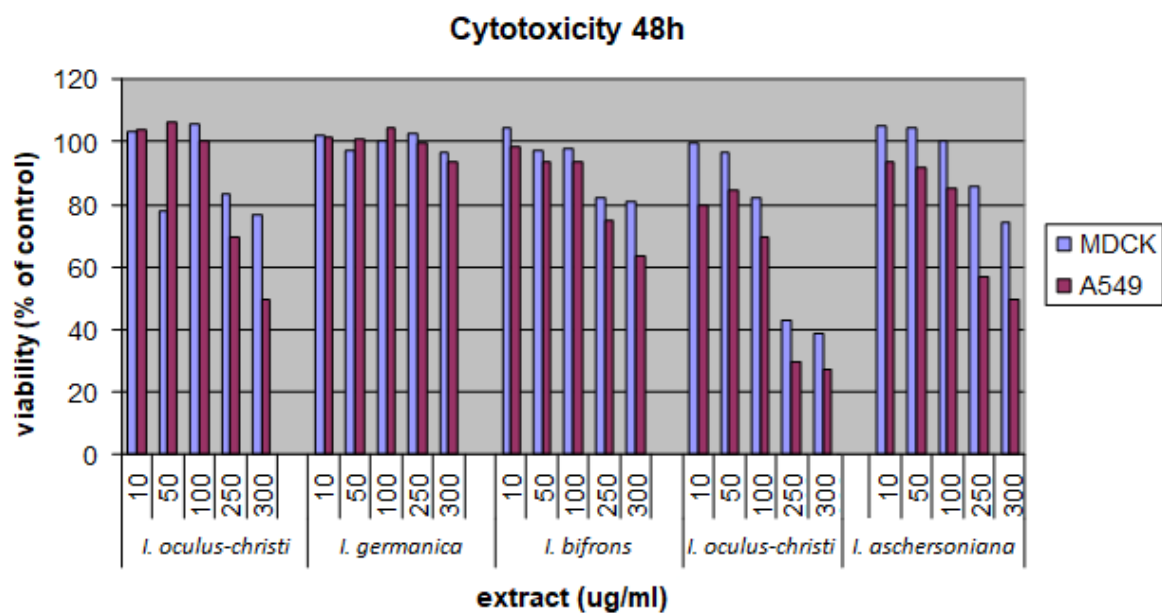
– Екстракт ВГ – 1/6 (*I. conyza*) подейства силно пролиферативно на клетки A549 (до 140% при концентрация 100 µg/ml на 24ч. от третирането). Имаше същото влияние, но изразено в по-малка степен върху клетки MDCK.



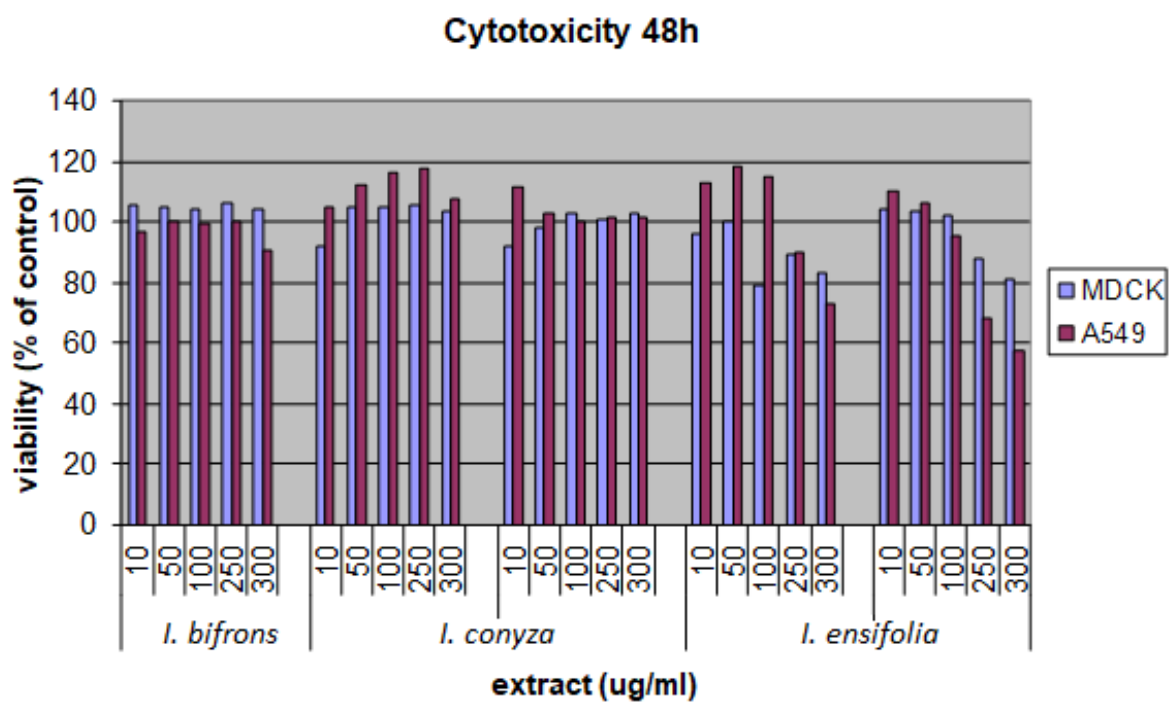
Фиг. 5. а)



Фиг. 5. б)



Фиг. 5. в)



Фиг. 5. г)

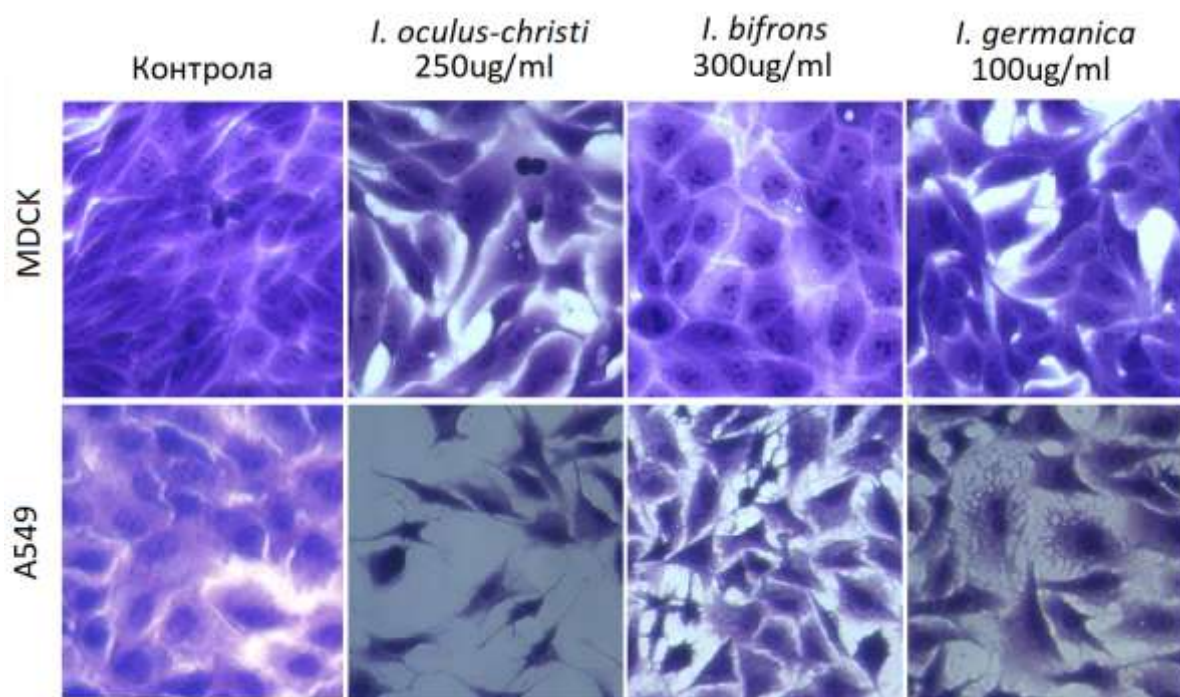
Фиг. 5. Цитотоксичност на метанолови екстракти от различни видове Инула, определена колориметрично след оцветяване с кристал виолет, проведено на 24ч. а),б) и 48ч. в),г) от третирането.

Всички метанолови екстракти имаха слаба цитотоксичност в концентрациите от тествания диапазон (10 - 300µg/mL) и към двете клетъчни линии. Нераковите клетки показаха признаци на клетъчен стрес в началото на третирането с по-високи концентрации на екстрактите от *I. ensifolia* (ВГ- 1/10; 2/2), *I. aschersoniana* (ВГ-2/4), *I. ocululus-christi* (ВГ – 2/6; 2/8), *I. bifrons* (ВГ-5/4; 5/2) и *I. germanica* (ВГ- 5/8), последвани от адаптация на 48-мия час от третирането. Екстрактът от цветове на *I. conyza* с по-високи концентрации на 1,5-DCQA и по-ниски концентрации на 3,4-DCQA, дори оказва пролиферативно действие върху клетките през първия ден на третирането, а за раковите клетки този ефект се запази и на 48-мия час, макар и в по-малка степен. От друга страна, екстрактът със сравнително високи концентрации от всички изследвани хлорогенни и дикафеоилхининови киселини (от *I. ensifolia*) намали броя на клетките концентрационно-зависимо, но без да достигне IC<sub>50</sub> и при двете клетъчни линии. Изключение правиха екстрактите от *I. ocululus-christi* (ВГ – 2/6; 2/8) и *I. aschersoniana* (ВГ-2/4), които достигнаха IC<sub>50</sub> за раковите клетки (A549), докато преживяемостта при същите условия за нераковите клетки (MDCK) беше повече от 75%. Ниската цитотоксичност на екстрактите би могла да се обясни със сравнително високото съдържание на хлорогенна киселина, за която има данни, че проявява добри антиоксидантни и цитопротективни свойства при невродегенеративни заболявания [15].

Морфологичният анализ потвърди ниската цитотоксичност на екстрактите. Морфологията на MDCK клетките изглеждаше по-малко засегната като цяло. След третиранията се появиха променени клетки с по-окръглена и форма и с прозрачни везикули в цитоплазмата. Наблюдавахме и клетки в различен етап от делене. A549 клетките бяха по-чувствителни към метаноловите екстракти от Инула и третираните проби имаха по-режав монослой в сравнение с контролата, което съответства на намалената преживяемост на третираните клетки. Под влияние на екстрактите се появиха издължени клетки с дълги и тънки цитоплазмени израстъци и светла, прозрачна цитоплазма в клетъчната периферия. На 24-тия час от третирането със 100µg/ml екстракт от *I. germanica* открихме туморни клетки със силно вакуализирана цитоплазма. Някои от най-типичните промени са представени на фиг. 6. Микрографиите са направени на 24. час, а клетките са третирани със 100 (*I. germanica*), 250 (*I. ocululus-christi*) и 300 (*I. bifrons*) µg/mL съответно. За представяне на пробите, третирани с *I. ocululus-christi* и *I. bifrons* беше избрана съпоставима степен на



цитотоксичност. Екстрактът от *I. germanica* не показва висока цитотоксичност, но клетъчната морфология беше увредена и имаше признаци за нарушен пермеабилитет на мембраната. Всички други екстракти не повлияха видимо клетъчните монослоеове след третиране (фиг. 6.). В наши допълнителни изследвания с друга двойка неракова и ракова клетъчна линия (HFF и HepG2) екстрактът от *I. helenium* не прояви цитотоксичност към нетуморните клетки, докато преживяемостта при туморните беше под 40% на втория ден от третирането. Анализа на данните от клетъчната морфология подкрепи резултатите от колориметричния анализ - в HFF клетките не се наблюдаваха съществени изменения, предизвикани от екстрактите, докато при HepG2 открихме вакуолизиране на цитоплазмата и намален брой клетки. Подобни на наблюдаваните от нас морфологични промени са съобщени след третиране на туморни клетъчни линии с екстракти от *I. helenium* [16]. В своето изследване авторите потвърждават чрез наблюдение с електронна микроскопия някои признаци за клетъчен стрес като кондензация на хроматина, множество везикули в цитоплазмата, раздуване и разкъсване на митохондриите, които са най-изявени в туморните клетки, докато нормалните лимфоцити от периферната кръв остават непроменени.



Фиг. 6. Морфологични промени в клетки MDCK и A549, наблюдавани след третиране с метанолови екстракти от различни видове Инула. Оцветяване с кристал виолет. Увеличение 400x.

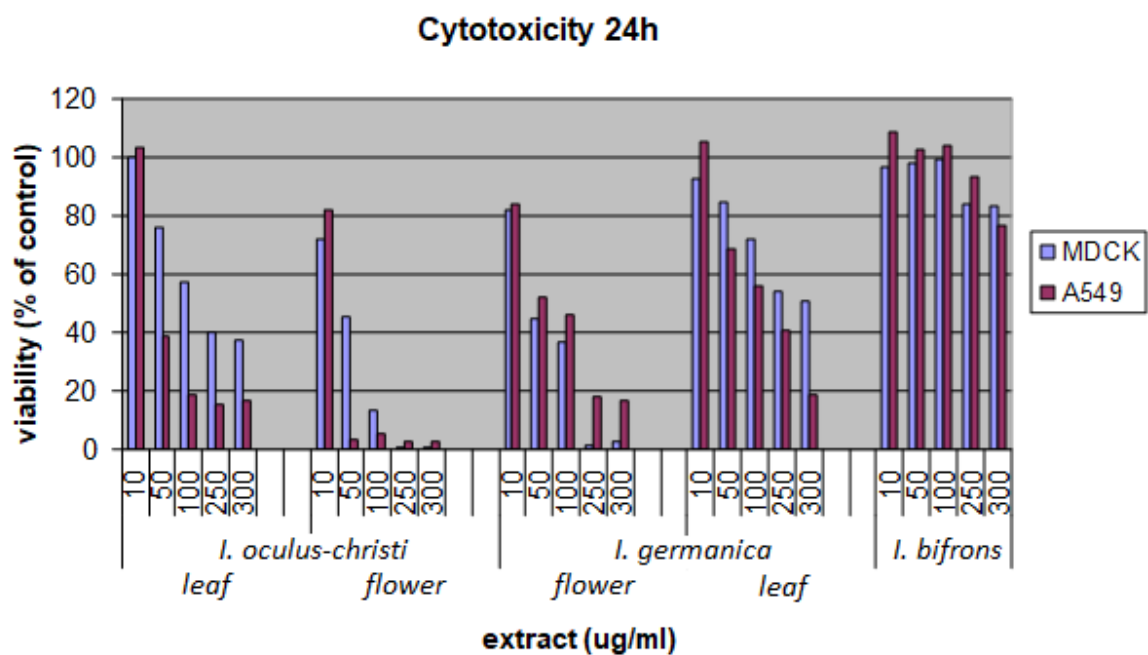
### 2.1.2. Хлороформени екстракти.

Вид	Хлороформени екстракти от лист	Хлороформени екстракти от цвят	Хлороформени екстракти от надземните части
<i>I. oculus-christi</i>	VG-39/18	VG-39/10	
<i>I. germanica</i>	VG-5/5	VG-5/7	
<i>I. bifrons</i>	VG-5/1		
<i>I. aschersoniana</i>	VG-2/3	VG-2/1	
<i>I. conyza</i>		VG-1/5	
<i>I. ensifolia</i>			VG-1/9
<i>I. salicifolia</i>	VG-4/3		

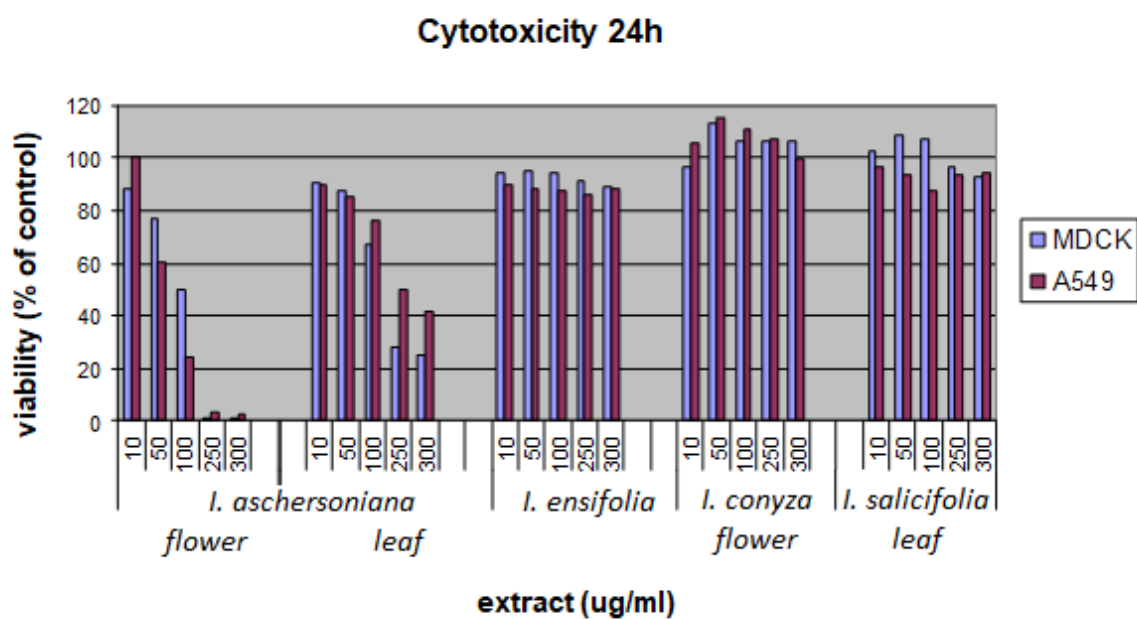
Табл. 2. Хлороформени екстракти от различни български видове от род Инула.

Изследвахме хлороформени екстракти от седем вида Инула, растящи в България: *Inula oculus-christi*, *I. bifrons*, *I. aschersoniana*, *I. ensifolia*, *I. conyza*, *I. salicifolia* и *I. germanica* (табл. 2). Сред изследваните хлороформени екстракти най-силна цитотоксичност проявиха екстракти **ВГ – 39/10, 39/18** (*I. oculus-christi*), **2/1** (*I. aschersoniana*), **5/5** (*I. germanica*). Тяхната активност към раковите клетки беше значително по-висока в сравнение с влиянието им към клетки MDCK. Най- обещаващ резултат за избирателно действие спрямо малигнените клетки беше регистриран на 48ч. от третирането с екстракт **ВГ – 39/18** в концентрация 50 µg/ml (преживяемост за A549 – 8.4%, а за MDCK ~ 80%). При екстракт **ВГ – 2/1** на 48ч. след третиране със същата концентрация (50 µg/ml) бяха достигнати стойности на преживяемостта на карциномните клетки от 51%, докато за нераковите – с 25% по-висока от IC<sub>50</sub> (фиг. 7.).

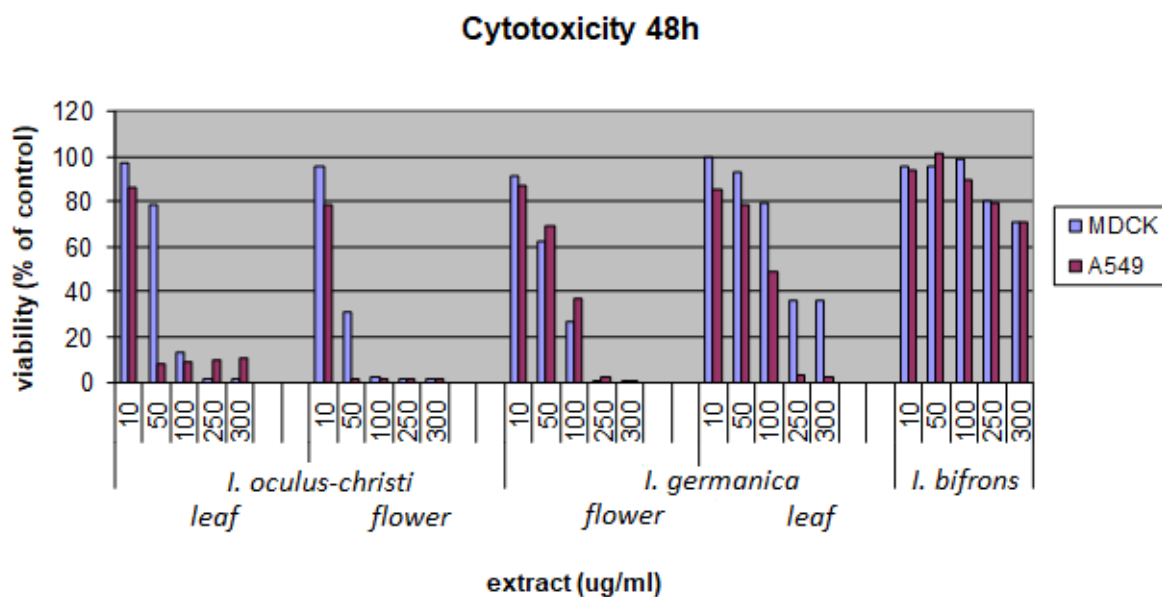
След 24ч. третиране с 50 µg/ml от екстракт **ВГ – 5/7** (*I. germanica*) преживяемостта и за двете клетъчни линии беше около 50%. Екстрактът оказва по-силно въздействие върху нераковите клетки. Тази тенденция се запазва и на 48ч., като при високите концентрации разликите в цитотоксичността се заличават и преживяемостта на клетките е близка до 0% (фиг. 7.).



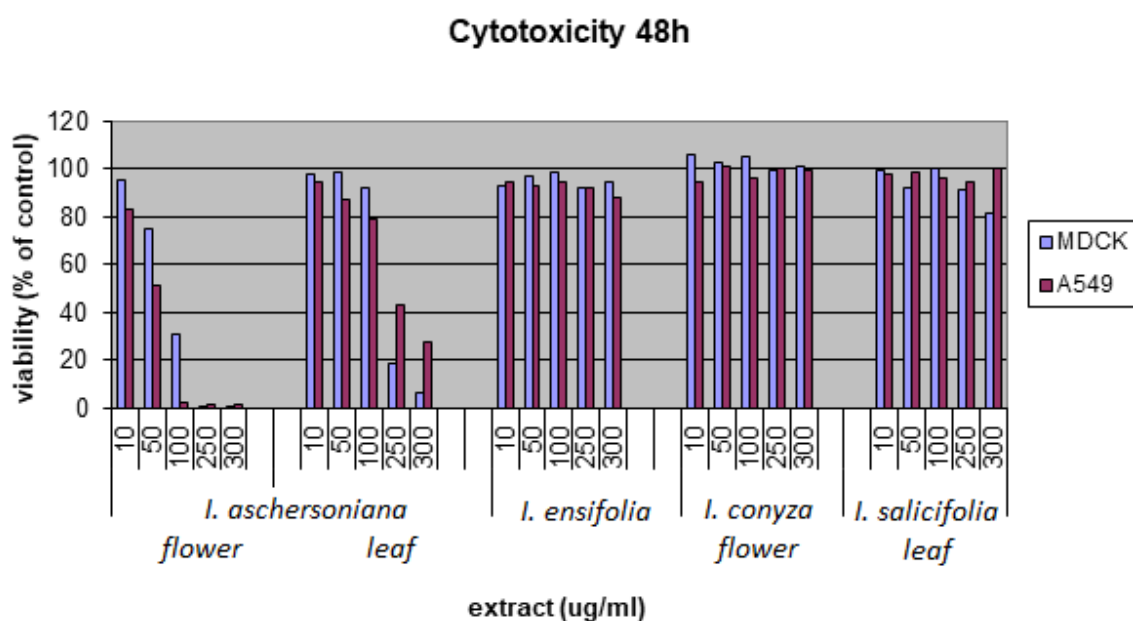
Фиг. 7. а)



Фиг. 7. б)



Фиг. 7. в)



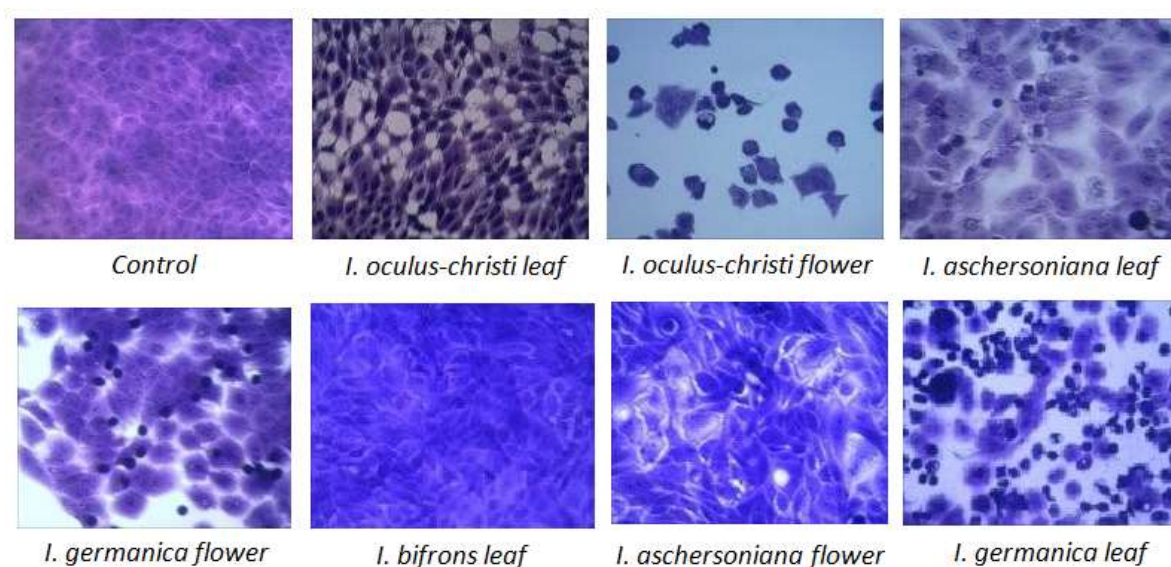
Фиг. 7. г)

Фиг. 7. Цитотоксичност на хлороформени екстракти от различни видове Инула, определена колориметрично след оцветяване с кристал виолет, проведено на 24ч. а),б) и 48ч. в),г) от третирането.

Влиянието на екстракт **ВГ – 2/3** (*I. aschersoniana*) при концентрация 250  $\mu\text{g/ml}$  на 24ч. от третирането беше по-силно към клетки MDCK (преживяемост – 28,6%) и се достигна  $\text{IC}_{50}$  за карциномните клетки. На 48ч. цитотоксичността се повиши, като се запази тенденцията за по-голяма активност спрямо нераковите клетки (фиг. 7.).

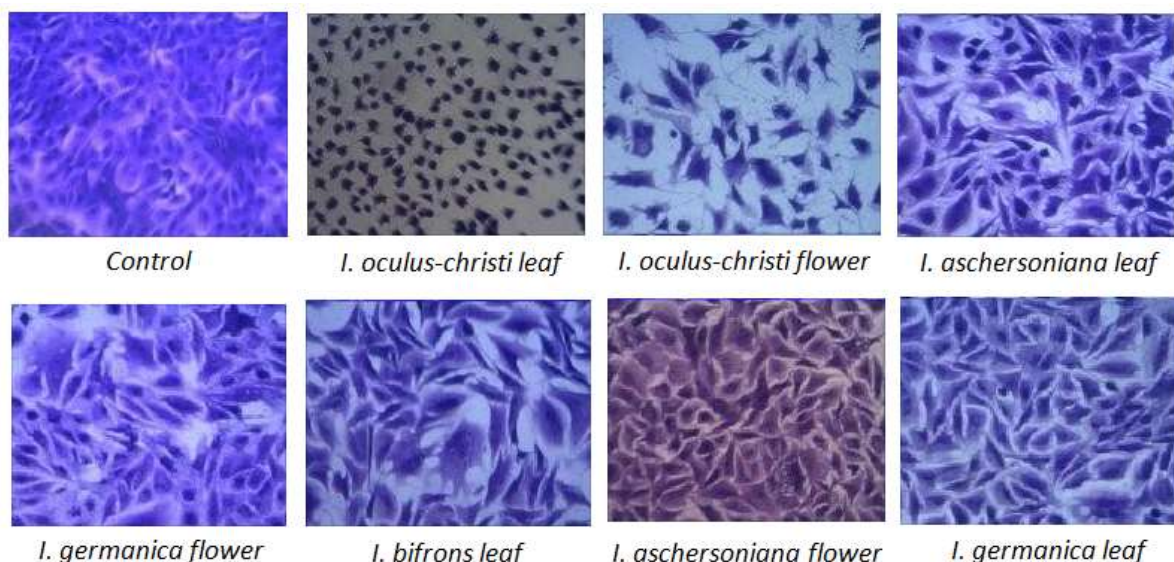
Действието на екстракт ВГ – 5/1 (*I. bifrons*) не прояви съществена разлика между двете клетъчни линии, като след 48- часово третиране с най-високата използвана концентрация беше отчетен 30% спад на жизнеспособните клетки спрямо контролните проби (фиг. 7.).

Екстракти ВГ – 1/9 (*I. ensifolia*), 4/3 (*I. salicifolia*) и, 1/5 (*I. conyza*) не проявиха значим цитотоксичен ефект в рамките на условията на експеримента. Жизнеспособните клетки и на 48ч. от третирането останаха близо до 100%, сравнени с контролните проби. Екстракт ВГ – 1/5 дори прояви известно пролиферативно действие на 24ч. при концентрация от 50 µg/ml (фиг. 7.).



Фиг. 8. Морфологични промени в клетки MDCK, наблюдавани след третиране с хлороформени екстракти от различни видове Инула. Оцветяване с кристал виолет. Увеличение 400х.

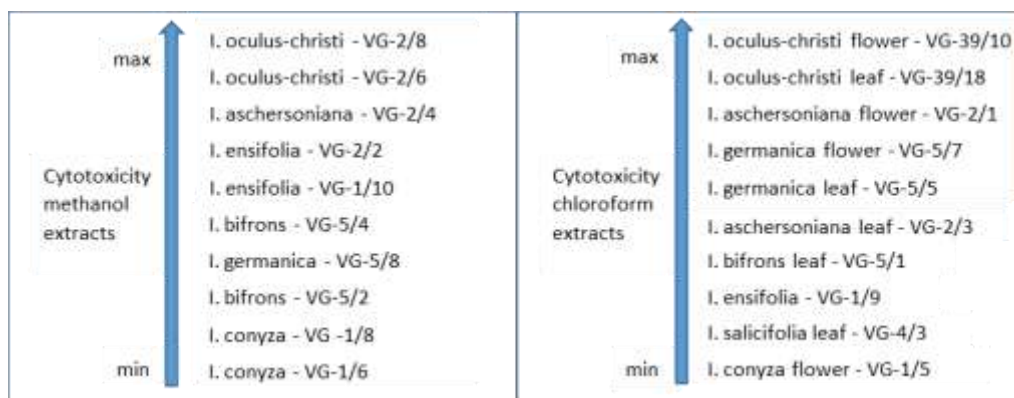
Анализът на измененията в морфологията, предизвикани от някои от екстрактите показва данни за нарушени клетъчни контакти и увреждания в клетъчната периферия. Клетките притежават белези, които биха могли да се интерпретират като възникнали в следствие на условия на клетъчен стрес (фиг. 8 и фиг. 9.).



Фиг. 9. Морфологични промени в клетки A549, наблюдавани след третиране с хлороформни екстракти от различни видове Инула. Оцветяване с кристал виолет. Увеличение 400х.

Хлороформният екстракт от лист на *I. oculus-christi* показва най-добри резултати с оглед на потенциално противораково действие. Екстрактът от цвят на същото растение беше още по-цитотоксичен и прояви достатъчно голяма разлика в активността към двата вида клетки, но в бъдещи експерименти е необходимо да се прецизира активното вещество и концентрация, при която ефективно да се повлияят раковите клетки, а за нераковите преживяемостта да остане близо до 100%.

Екстрактите от *I. germanica* също са сред най-активните от изпитваните екстракти. Екстрактът от лист обаче има отчетливо по-висока цитотоксичност към раковите клетки, докато при този от цвят има обратната тенденция.



Фиг. 10. Тотални хлороформни и метанолови екстракти от различни видове инула, подредени според силата на тяхната цитотоксичност.

Сред хлороформените фракции, екстрактите от растения, съдържащи сесквитерпенови лактони проявиха най- висока цитотоксичност, което е в съответствие с наличните данни в литературата за активността на тези съединения. Част от изследваните екстракти показаха значителна разлика в действието към ракови и неракови клетъчни линии, други стимулираха пролиферацията. Като цяло по-високата цитотоксичност на хлороформените екстракти е вероятно да се дължи именно на наличието на сесквитерпенови лактони. На фиг. 10. са представени изследваните екстракти, подредени според тяхната цитотоксичност.

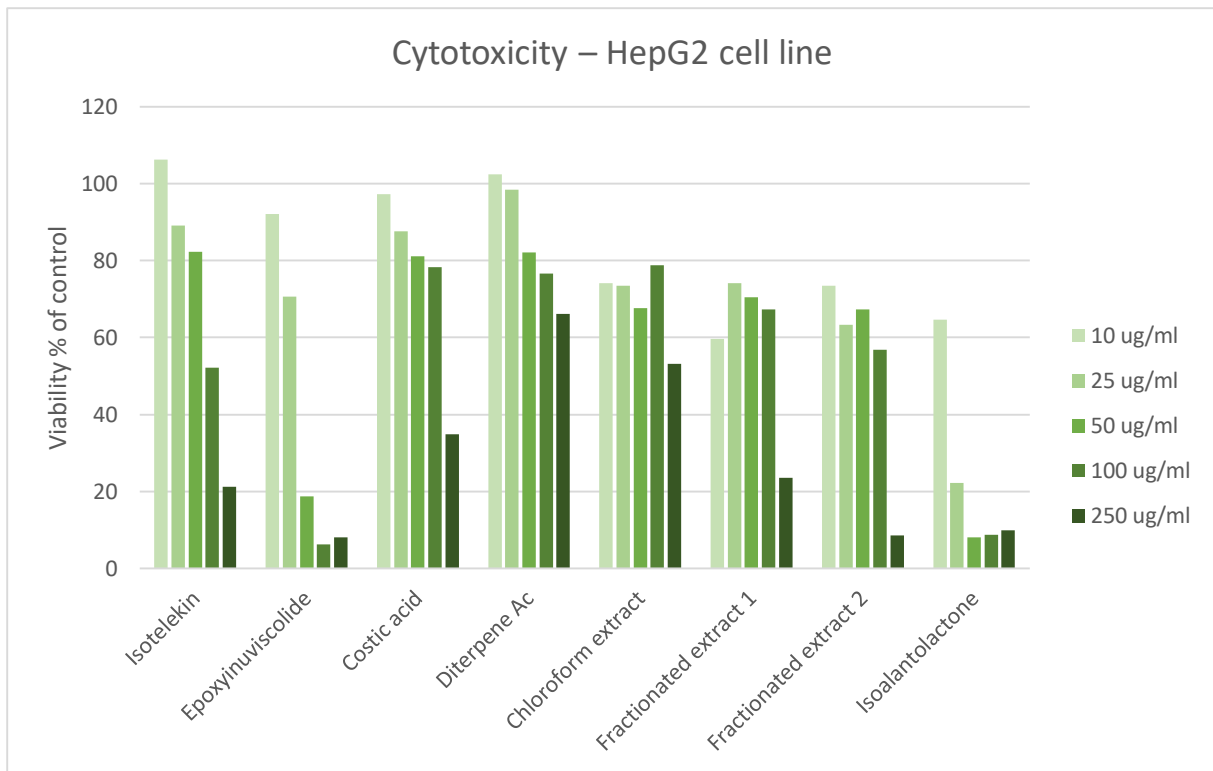
### 2.1.3. Екстракти от *Inula bifrons*.

Продължихме проучването на цитотоксичността на видовете от род *Inula*, като се концентрирахме върху екстракти от вида *Inula bifrons* (Двоестранен Оман). Използвахме хлороформен екстракт (101-1А), фракциониран екстракт 1 (101-9В), фракциониран екстракт 2 (101-11В), както и изолирани биологично активни вещества: Costic acid (92-1), Ерохуинуисколиде (92-3), Diterpene Ac (92-2), Isotelekin (93-3), Isoalantolactone (93-4). Като моделна система използвахме чернодробната ракова клетъчна линия с епителна морфология HepG2 и фибробластите с нетуморен произход HSF и HFF.

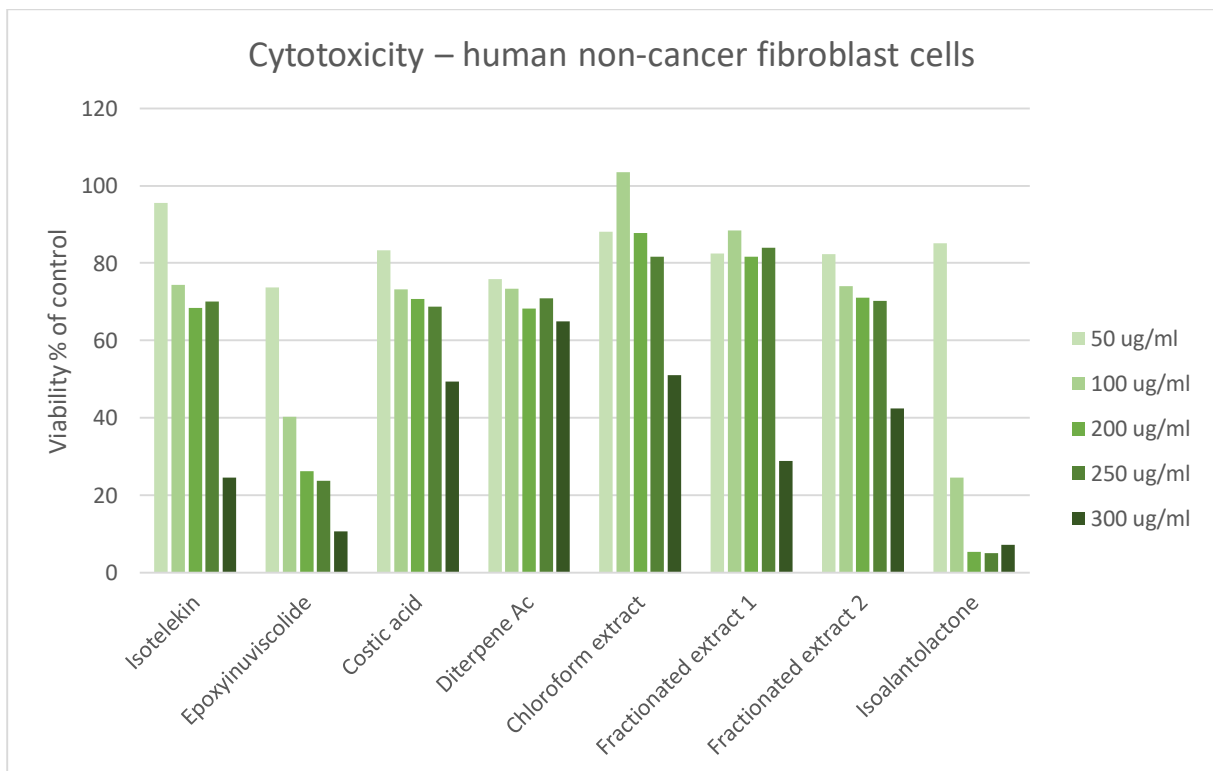
- Цитотоксичност

Експериментите бяха провеждани с продължителност от 48 часа. Сесквитерпеновият лактон Isoalantolactone прояви най-силна цитотоксичност. Това е в съответствие с наличните литературни данни, според които това съединение инхибира растежа на различни видове туморни клетки, като предизвиква апоптоза и притежава също така антигъбично и антихелминтно действие [17]. На 24. час при третиране с изоалантолактон (25 и 50 µg/ml) се прояви най-голяма разлика в отговора на туморни и нетуморни клетки, но на 48. час тя не се наблюдава. При фракциониран екстракт 2 след третиране с най-високата концентрация, използвана за експериментите наблюдавахме значително по-силно цитотоксично действие спрямо раковите клетки. Ерохуинуисколиде демонстрира значителна цитотоксичност както към раковите клетки, така и към нераковите (фиг. 11).

Изследваните екстракти, с изключение на Diterpene Ac и хлороформения екстракт, достигат до EC<sub>50</sub> в рамките на използваните концентрации и продължителността на експеримента.



Фиг. 11. а)



Фиг. 11. б)

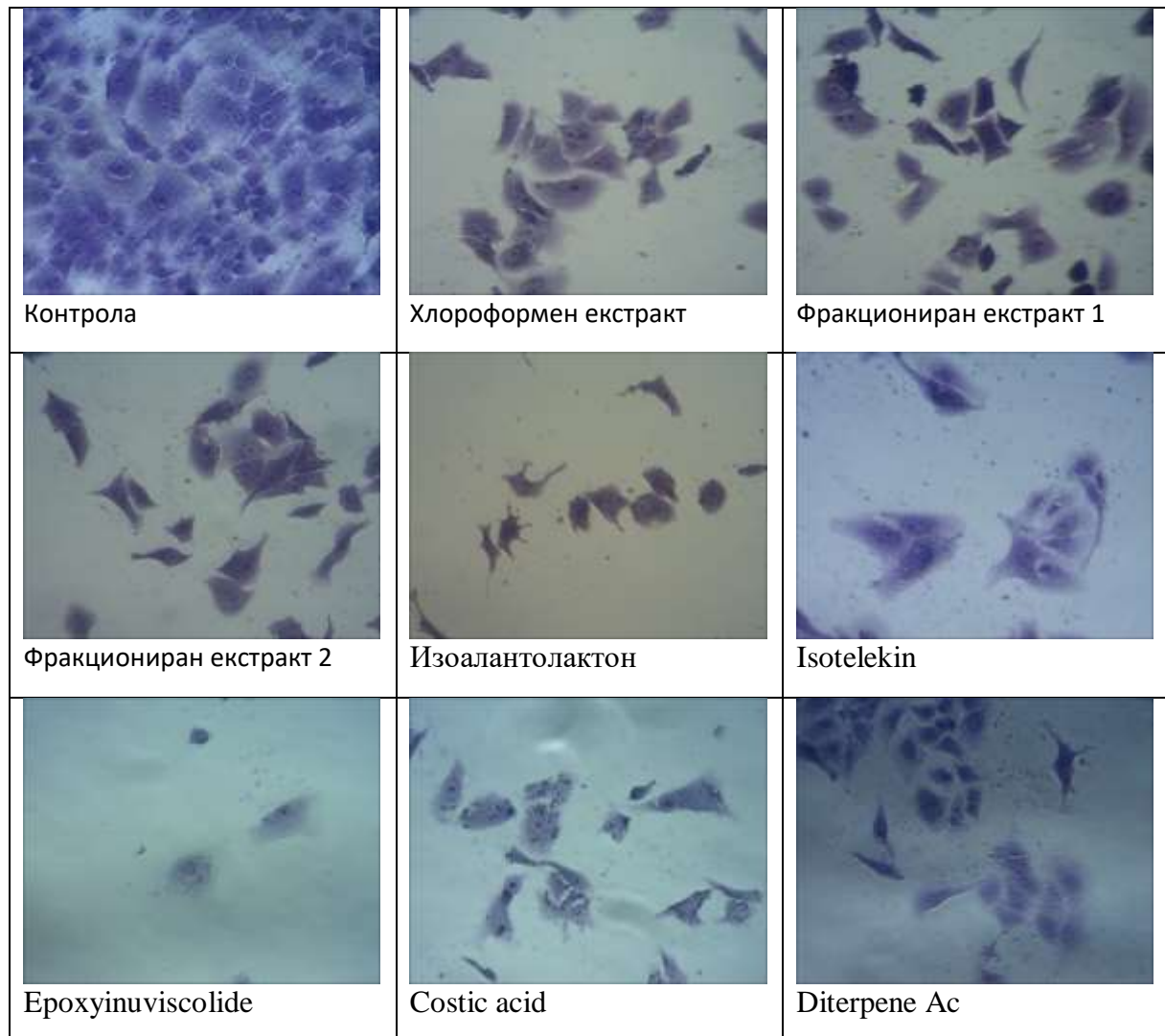
Фиг. 11. Цитотоксичност на екстракти от *Inula bifrons*, определена колориметрично след оцветяване с кристал виолет, върху клетъчна линия HepG2 а), човешки фибробласти б).



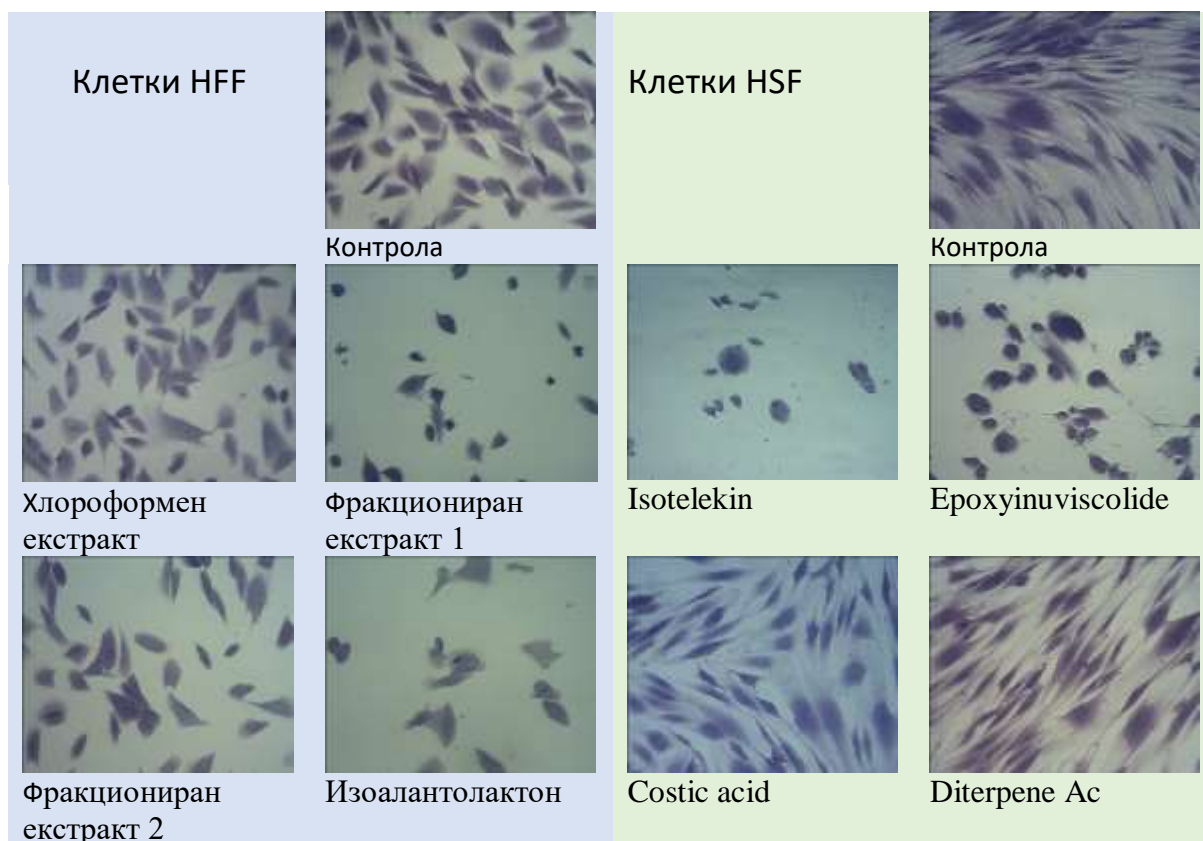
## Морфология

Контролните неракови клетки имаха издължена форма, типична за фибробластите. Нетретираните ракови клетки показаха характерната за клетъчната линия епителна морфология (фиг. 10.).

Клетки HFF и HSF бяха най-слабо засегнати от хлороформения екстракт, Costic acid и Diterpene Ac, което съответстваше и на по-слабата цитотоксичност на тези екстракти. Преживяемостта на клетките беше голяма и морфологията им беше запазена при третиране с тези вещества до 100  $\mu\text{g/ml}$  включително. При постепенно увеличаване на концентрациите на по-токсичните екстракти се наблюдаваше прогресивно намаляване на преживяемостта (намаляване на броя) и окръгляне на формата на клетките (фиг. 12.).



Фиг. 12. а)



Фиг. 12. б)

Фиг. 12. Морфологични промени в клетки HepG2 а), HFF и HSF б), наблюдавани след третиране с различни екстракти от *Inula bifrons*. Оцветяване с кристал виолет. Увеличение 400х.

Най-често срещаните промени след третиране на клетките от клетъчна линия HepG2 бяха гранулиране и изсветляване на цитоплазмата, намаляване на обема и свиване на клетката. В пробите, третирани с фракциониран екстракт 1 се откриваха клетки, по чиито клетъчни мембрани се наблюдаваха окръглени изпъкналости в контура, наподобяващи “blebs” (фиг. 12.).

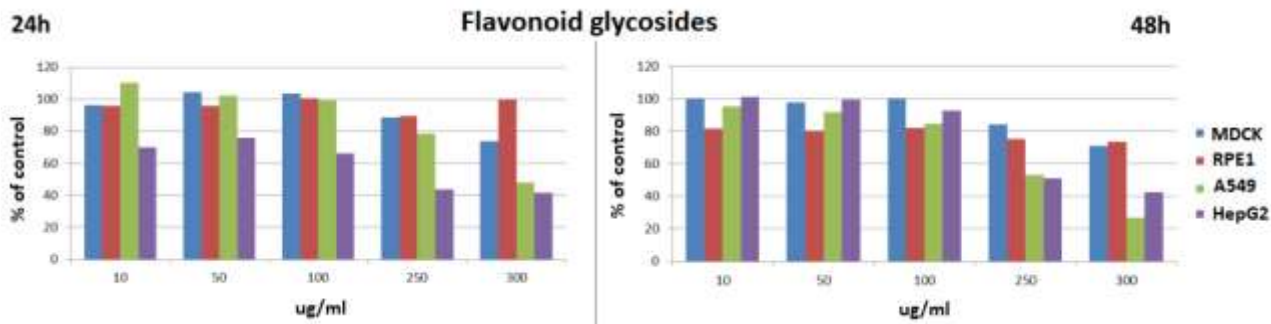
Друг вид Инула, който показва силна цитотоксичност и известна разлика в действието към ракови и неракови клетки (при приложение на определени концентрации) беше *Inula oculus-christi*. Продължихме изследванията с пречистени екстракти от този вид, обогатени с отделни групи биологично активни вещества.

#### 2.1.4. Екстракти от *I. oculus-christi*

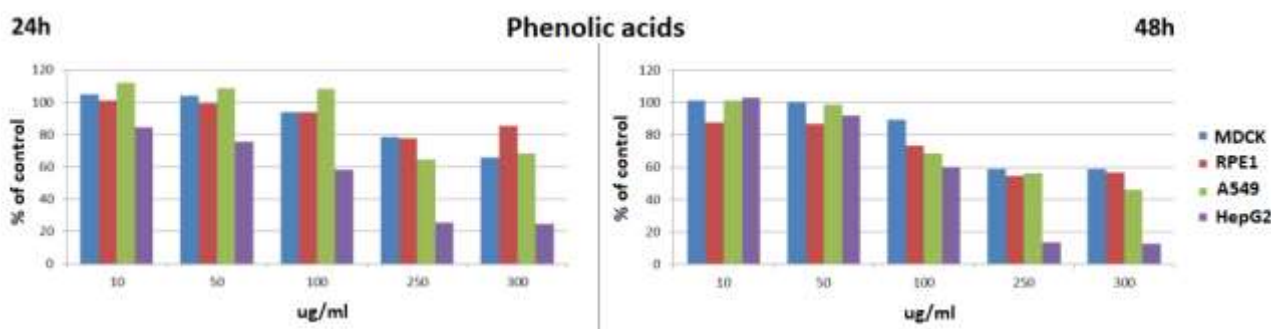
- **Изследване на екстракти, обогатени с флавоноидни гликозиди, флавоноидни агликони, фенолни киселини и комбинации от тях**
  - **Цитотоксичност**

От проучените видове, при *I. oculus-christi* се наблюдаваха най-отчетливи разлики в цитотоксичността между ракови и не-ракови клетки, което насочи нашето внимание към изследването на по-пречистени фракции с по-ясно дефиниран състав от тоталните екстракти от това растение. Фракции от метанолови екстракти, обогатени на флавоноидни гликозиди, фенолни киселини, комбинация от флавоноидни гликозиди и фенолни киселини, както и флавоноидни агликони и фенолни киселини бяха тествани върху клетки MDCK и A549, като включихме и две нови линии: нормалната RPE1 (ретинален пигментен епител) и раковата HepG2 (чернодробен карцином).

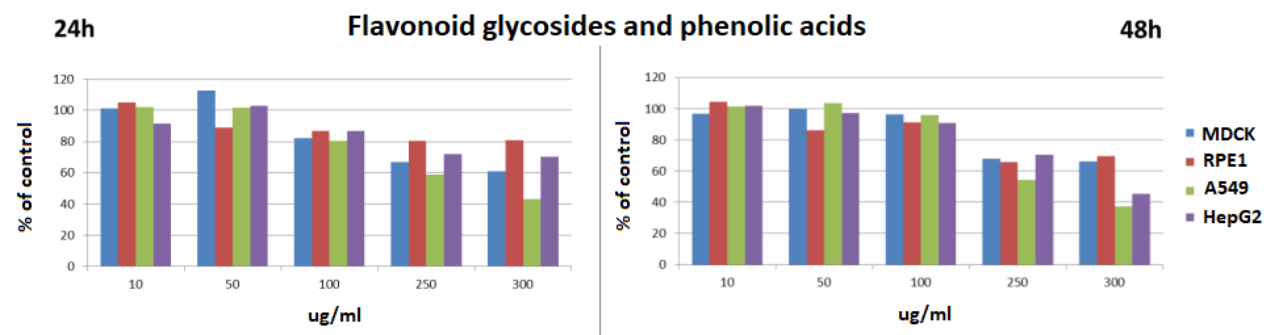
Получените резултати показаха, че след приложението на флавоноидните гликозиди се запази тенденцията раковите клетки да са по-чувствителни (на 48-я час преживяемостта за HepG2 беше ~ 40%, а за RPE1 ~ 75%). При фенолните киселини с концентрация над 100 µg/ml се наблюдаваше силна цитотоксичност за HepG2, което е в контраст с другите 3 линии, от които само A549 достига IC<sub>50</sub> за 48 час. Това показва, че тези екстракти не са токсични за нормалните клетки, но имат ясно изразен потенциал за противотуморно действие, като са цитотоксични дори и за силно резистентната линия A549. Изненадващо, при екстрактът обогатен с флавоноидни гликозиди и фенолни киселини се наблюдаваше обратна тенденция в преживяемостта на двете ракови клетъчни линии - на 24 час за A549 тя е малко над 40%, докато за HepG2 тя е ~ 70% (Фиг. 13.). Причините за такава разлика в преживяемостта би могло да се дължат на различният метаболитен фон на двете линии (едната произлиза от белодробни клетки, а другата – от черен дроб). За изясняването им са необходими допълнителни изследвания. При третирането с флавоноидни агликони и фенолни киселини като цяло се потвърдиха резултатите за ракови и неракови клетки, но с по-слабо изразени разлики (Фиг. 13.). Вероятно в общите екстракти тези съединения имат адитивен ефект върху раковите клетки.



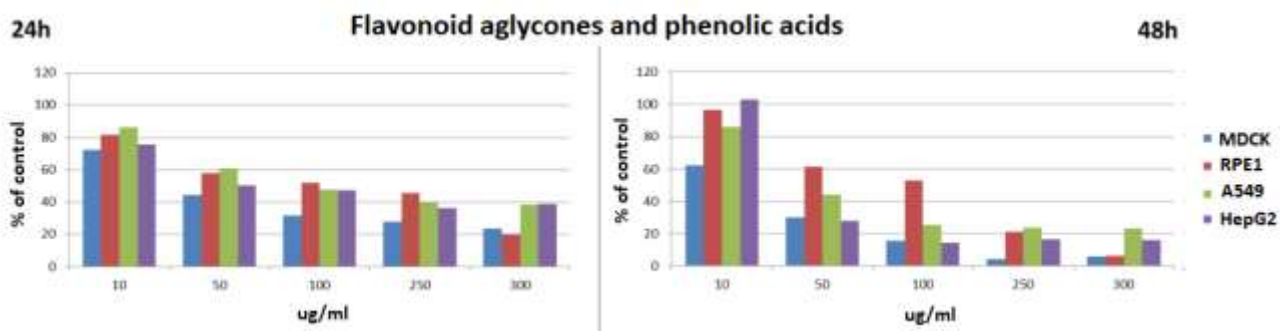
Фиг. 13. а)



Фиг. 13. б)



Фиг. 13. в)



Фиг. 13. г)

Фиг. 13. Цитотоксичност на екстракти от *I. oculus-christi*, обогатени с флавоноидни гликозиди а), фенолни киселини б), флавоноидни гликозиди и фенолни киселини в), флавоноидни агликони и фенолни киселини г). Изследване с кристал виолет на 24-тия и 48-мия час от третирането.

Обобщени данни от получените резултати за IC<sub>50</sub> са представени в таблица 3.

Клетъчна линия	MDCK II		RPE1		A549		HepG2	
Екстракт/час	24	48	24	48	24	48	24	48
Флавоноидни гликозиди	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	295	256	207,5	256
Фенолни киселини	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	280	137,5	133
Флавоноидни гликозиди и фенолни киселини	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	280	262	Няма данни	292
Флавоноидни агликони и фенолни киселини	40	27	148	114	92	45	50	40

Табл. 3. Стойности на IC<sub>50</sub> в ug/ml на съответните растителни екстракти за тестваните клетъчни линии. Няма данни в случаите, в които концентрации IC<sub>50</sub> не са достигнати в рамките на изследването.

#### – Анализ на клетъчната морфология.

Морфологията на клетъчните линии, използвани за тези изследвания е епителна. Нетретираните клетки MDCK образуват монослой с множество плътни и адхерентни междуклетъчни контакти, които са специфични за тях. Клетъчна линия RPE1 образува по-режав монослой с по-плоски и широко разстлани по повърхността за култивиране клетки в сравнение с бъбречния епител. HepG2 клетките при ниска конfluентност образуват островчета от струпвания на клетки, а при конfluентен монослой наподобяват A549 (фиг. 14.).

Морфологията на нераковите клетки не беше значително променена след приложение на екстракта обогатен с флавоноидни гликозиди и съдържаща комбинация от флавоноидни гликозиди с фенолни киселини. Въпреки, че се появяват отделни изменени клетки, пробите бяха слабо засегнати като цяло. След третиране с фенолни киселини и двете неракови линии имаха изменения в цитоплазмата - прозрачни везикули в MDCK, а в RPE1 - плътни агрегати и светли области от цитоплазмата. Екстрактът, който е най-наситен с антиоксиданти (флавоноидни агликони и фенолни киселини) се оказа най-токсичен и за четирите изследвани клетъчни линии. Морфологията на MDCK беше значително увредена - с атипична, неправилна клетъчна форма; изпълнена с везикули и гранули цитоплазма; в някои от ядрата се наблюдаваше централно струпване на хроматин. Везикулите в цитоплазмата на RPE1 клетките бяха изпълнени с плътна субстанция (фиг. 14.).

Промените в A549, предизвикани от екстрактите са както следва: комбинираните екстракти (флавоноидни гликозиди с фенолни киселини и флавоноидни агликони с фенолни киселини) провокираха формирането на дълги и тънки цитоплазмени израстъци; третирането с флавоноидни гликозиди доведе до появата на множество везикули сред светла, прозрачна цитоплазма; екстрактът с фенолни киселини стимулира формирането на големи, прозрачни везикули с плътна субстанция в тях (фиг. 14.).

Морфологията на клетъчна линия НерG2 беше най-увредена след приложение на екстрактът с фенолни киселини - наблюдавах се свити клетки и дълги цитоплазмени израстъци. Подобни изменения, но в по-лека форма бяха причинени и от другите екстракти (фиг. 14.).

Наблюдавахме изменения в морфологията, които говорят за нарушени клетъчни контакти и увредена клетъчна периферия. Подобно на някои от резултатите, получени след третиранията с по-общи екстракти, клетките изглеждаха подложени на стрес. Често се наблюдаваше цитоплазмена вакуолизация, ядрени аномалии, пикнотични ядра, а в някои случаи клетките бяха със значително намален обем на цитоплазмата и образуваха дълги шиповидни израстъци, подобни на филоподи.

Въз основа на резултатите можем да обобщим: 1) Сред тестваните екстракти екстрактът, обогатен с флавоноидни гликозиди показва най-голяма разлика в действието върху неракови и ракови клетки - проявена беше известна специфичност към раковите клетки; 2) Екстрактът с флавоноидни гликозиди и фенолни киселини не оказва значително влияние върху клетъчна линия НерG2, докато флавоноидните гликозиди и фенолните киселини по отделно проявиха известна цитотоксичност към тези клетки, което беше потвърдено от анализа на клетъчната морфология; 3) Тъй като екстрактът с флавоноидни агликони и фенолни киселини показва най-силна цитотоксичност от четирите екстракта може да се предположи, че флавоноидите и фенолните киселини взаимно потенцират ефекта си, но присъствието на гликозид в структурата на флавоноидите компенсира и намалява ефекта на фенолните киселини; 4) Общата тенденция която наблюдавахме, беше че цитотоксичността на изследваните екстракти се повишава с времето на приложение. Изключение правят клетки НерG2, които претърпяват отчетлива адаптация към флавоноидните гликозиди. При концентрации в диапазона 10-100  $\mu\text{g/ml}$  преживяемостта е с около ~30% по-висока на 48-мия час в сравнение с първия ден от третирането. Това се потвърждава и от стойностите на  $IC_{50}$

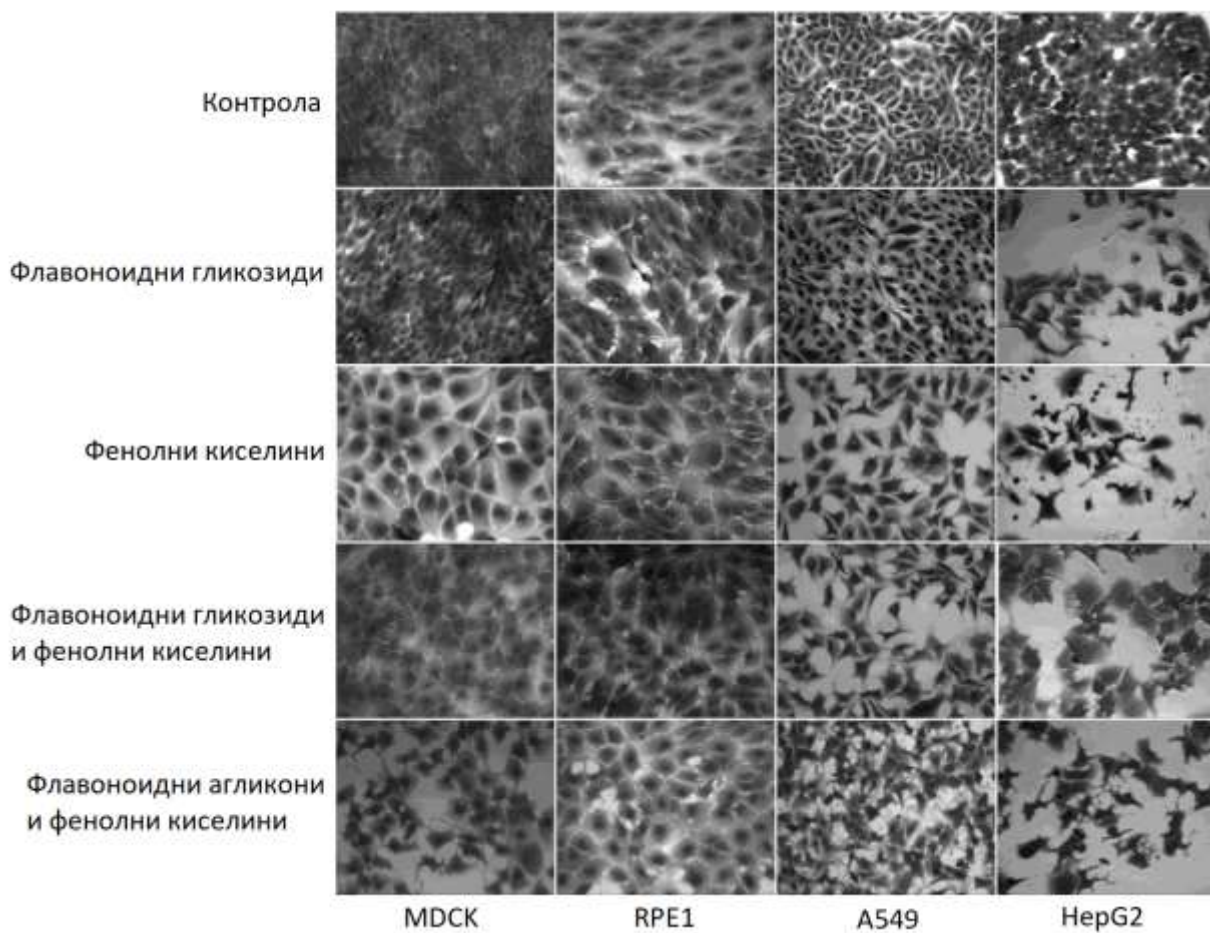
(24h – 207.5 µg/ml; 48h – 256 µg/ml). Същото, но в по-малка степен важи и за действието на фенолните киселини върху HepG2 клетките.

Флавоноидните агликони, флавоноидните гликозиди и фенолните киселини като антиоксиданти са добре познати с тяхното благоприятно въздействие върху човешкото здраве и антитуморни свойства [18 - 24]. В настоящото изследване открихме, че екстрактът от *I. oculus-christi*, обогатен с флавоноидни гликозиди слабо повлия нормалните клетъчни линии, докато беше отчетена значителна цитотоксичност върху раковите (клетъчни линии) при третиране с по-високите концентрации. Фенолните киселини бяха значително по-токсични към клетки HepG2 в сравнение с по-резистентните A549 и нераковите клетъчни линии.

Съществуват данни за противоречиво действие на фенолната киселина protocatechuic acid след външно приложение върху рак на кожата при мишки [25]. Ниска доза от това вещество инхибира нарастването на тумора, подобно на нашите резултати, при които екстрактът, обогатен с флавоноидни гликозиди и този, обогатен с фенолни киселини проявиха цитотоксичен ефект върху изследваните от нас ракови клетъчни линии. Накамура и сътрудниците му откриват също така, че високи дози от изследваната от тях фенолна киселина причиняват уголемяване на туморните размери и повишаване на нивата на биомаркерите за оксидативен стрес - увеличават се оксидативните увреждания, предизвикани от високи концентрации силен антиоксидант. Агентите, обезвреждащи свободните радикали е възможно да имат про-оксидативен потенциал заради превръщането на самите антиоксиданти в реактивни форми след прякото им взаимодействие с ROS и това може да допринесе за предизвикване на вторично оксидативно увреждане на органите. Доказано е, че в резултат от окислението на флавоноидите в средата за култивиране се образува H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, и това се предполага че стои в основата на техния прооксидативен ефект, когато надвишат определени концентрации [26]. В настоящото изследване разкрихме, че екстрактът, обогатен с флавоноидни агликони и фенолни киселини, който е най-наситен с антиоксиданти прояви най-силната цитотоксична активност сред тестваните екстракти. Необходими са допълнителни изследвания, за да разберем дали тази цитотоксичност се дължи на парадоксалният прооксидативен ефект на антиоксидантите. Същевременно расте броят на литературните данни за важната роля на оксидативния стрес в развитието на туморите.

Изследване на цитотоксичността на осем различни флавоноида показва, че флавоноидите с най-голяма липофилност са най-токсични [27], като цитотоксичността на тези флавоноиди намалява успоредно с увеличаването на броя на гликозидните и хидроксилните групи във флавоноидните съединения. Това е една от възможните причини за по-ниската цитотоксичност на екстрактът, съдържащ флавоноидни гликозиди и фенолни киселини, в сравнение с екстрактът, съдържащ флавоноидни агликони и фенолни киселини.

След третиране с флавоноидни гликозиди, фенолни киселини и комбинация от флавоноидни гликозиди и фенолни киселини не отчетохме значителен спад в преживяемостта на нераковите клетъчни линии, но наблюдавахме някои изменения в морфологията на клетки MDCK (Фиг. 14.). Това означава, че са необходими допълнителни изследвания, които да докажат безопасността на тези екстракти по отношение на бъбречната функция.



Фиг. 14. Промени в морфологията на тестваните клетъчни линии, предизвикани от съответните екстракти от *I. oculus-christi*. Оцветяване с кристал виолет. Увеличение 400х.



За да докажем евентуалния антагонистичен, адитивен или синергичен ефект между флавоноидните гликозиди и фенолните киселини изчислихме комбинационният индекс, в случаите, в които това беше възможно. Комбинационният индекс беше

$$CI = \frac{IC_{50}(A+B)}{IC_{50}(A)} + \frac{IC_{50}(A+B)}{IC_{50}(B)}$$

изчислен според формулата , където IC50 (A) и IC50 (B) са стойностите на IC50, получени при приложение на отделните вещества самостоятелно, а IC50 (A + B) е стойността на IC50 при приложение на комбинация от двете вещества. В зависимост от резултата CI = 1, съответства на адитивен ефект, CI < 1 показва синергичен ефект, докато CI > 1 предполага антагонистичен ефект (Emamzadeh et al., 2018). Ние получихме стойности на CI = 1,959 за клетки A549 и CI = 3,336 за клетки HepG2 след третиране за 48 часа с комбиниран екстракт от флавоноидни гликозиди и фенолни киселини, което показва антагонистичен ефект между флавоноидните гликозиди и фенолните киселини и за двете клетъчни линии.

Описаните промени в морфологията, предизвикани от екстрактите са показателни за нарушени междуклетъчни контакти и увреждания в клетъчния граничен комплекс. Механизмите на тази активност се нуждаят от допълнително изясняване чрез последващи експерименти.

- **Изследване на биологичната активност на сесквитерпенови лактони и полифеноли.**

Тъй като, според нашите резултати и литературните данни, екстрактите съдържащи сесквитерпенови лактони притежават силно цитотоксично действие, ние продължихме изследванията си, като използвахме пречистен екстракт от *I. oculus-christi*, съдържащ сесквитерпенови лактони и сравнихме действието му с екстракт, обогатен на полифеноли (фенолни киселини и флавоноиди) върху клетки MDCK и A549.

#### – Цитотоксичност

Раковите и нераковите клетки проявиха различна чувствителност към двата екстракта. Сесквитерпеновите лактони бяха силно токсични и към двете клетъчни линии в концентрации, по-високи от 50 µg/ml. Наблюдавахме значително намаляване на преживяемостта след третиране за 24 часа и ефектът беше много по-силно изразен при раковите клетки. При нераковите клетки наблюдавахме три пъти по-голяма преживяемост дори след третиране с най-високите използвани концентрации на

екстракта (Фиг. 15.). Открихме подобна тенденция и на втория ден от третирането. Най-голяма разлика в действието върху двете клетъчни линии беше отчетена при концентрации в диапазона 10-60  $\mu\text{g/ml}$  (при концентрация на екстракта от 20  $\mu\text{g/ml}$  наблюдавахме 55% преживяемост на раковите клетки, за нераковите клетки тази стойност беше 90%). Резултатите ни съответстват на литературните данни за биологичната активност на лактоните, синтезирани от различни растения, за които е известно, че притежават противотуморно действие [28 - 30]. Експериментално е доказано и от други автори, че сесквитерпенови лактони, получени от представители на рода *Инула* проявяват силно цитотоксично действие спрямо няколко ракови клетъчни линии [29]. Тествана е цитотоксичността на сесквитерпеновият лактон *gaillardin*, изолиран от *I. oculus-christi*, спрямо няколко туморни клетъчни линии, както и способността му да предизвика апоптоза в клетки MCF-7, с обнадеждаващи резултати и препоръка за по-задълбочено изследване на неговото противотуморно действие [31].

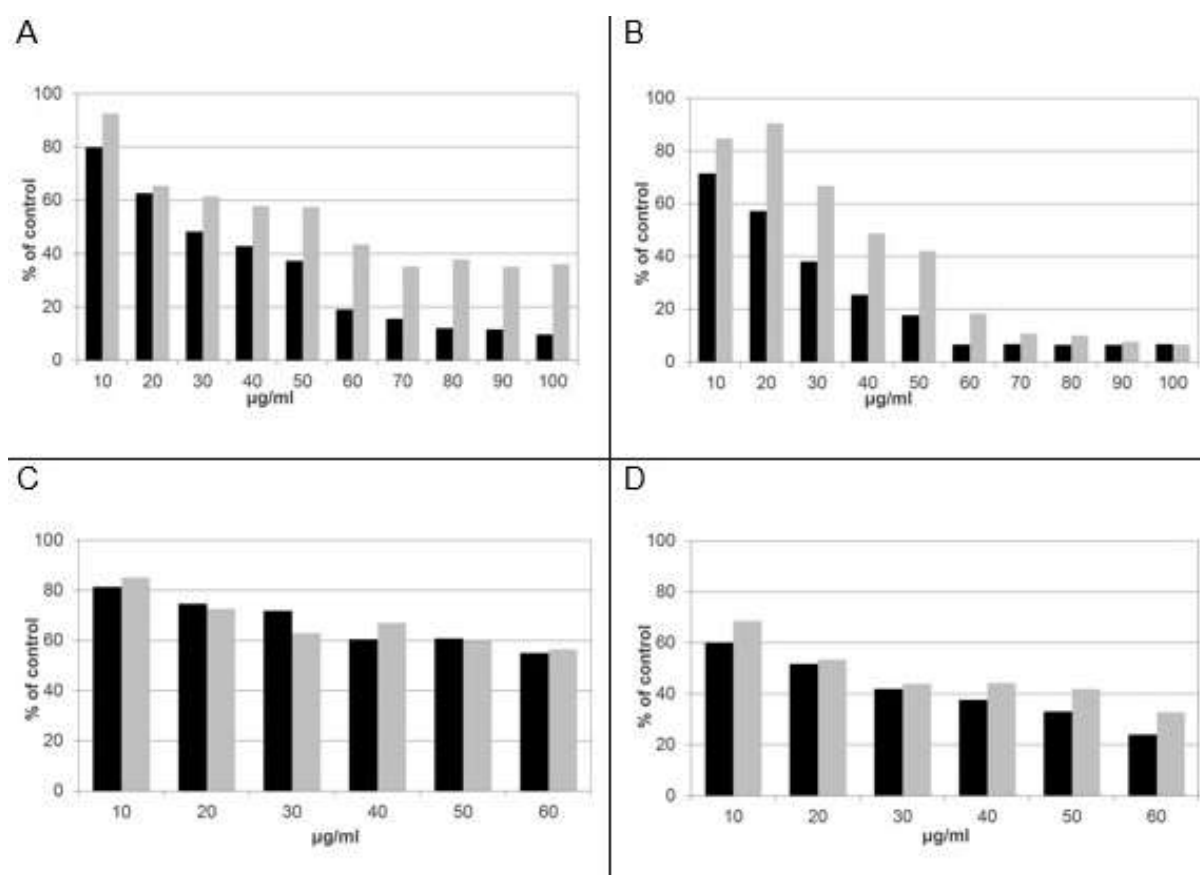
От друга страна е установено, че фенолните киселини също имат онкопротективни свойства. Те са разнороден клас вещества антиоксиданти и е доказано, че те притежават антипролиферативно действие [32]. Екстрактът, обогатен с полифеноли прояви по-слаб цитотоксичен ефект в сравнение със сесквитерпеновите лактони. След третиране за 24 часа с най-високата използвана концентрация (60  $\mu\text{g/ml}$ ) малко над 50% от клетките преживяха и нямаше значителна разлика между двете клетъчни линии, като екстракта не предизвика съществени морфологични промени. На втория ден отчетохме по-силен цитотоксичен ефект, но се запази малката разлика в чувствителността на двете клетъчни линии.

Нашите резултати показаха, че сесквитерпеновите лактони от *I. oculus-christi*, имат значително по-голям цитотоксичен ефект към двете клетъчни линии в сравнение с полифенолите и по-специфично действие към раковата клетъчна линия. Тези резултати потвърждават други изследвания на лактони от различни източници, показващи противотуморна активност [33]. Въз основа на резултатите бяха определени  $IC_{50}$  за двата екстракта на 24 и на 48 час от третирането. Изчислените стойности на  $IC_{50}$  за сесквитерпеновите лактони при клетки A549 бяха едни и същи, независимо от продължителността на третирането. При клетки MDCK на 24 час  $IC_{50}$  беше значително по-висока в сравнение с 48-мия час от експеримента, което предполага, че тези клетки стават по-чувствителни с времето.

Екстрактът, обогатен с полифеноли не показва такава силно дозо-зависима активност и  $IC_{50}$  не беше достигната през първия ден от третирането и за двете клетъчни линии. На втория ден  $IC_{50}$  беше достигната и имаше близки стойности и за двата типа клетки (табл. 4.).

$IC_{50}$	Сесквитерпенови лактони		Флавоноиди и фенолни киселини	
	24h	48h	24h	48h
A549	25 $\mu$ g/ml	25 $\mu$ g/ml	-	22 $\mu$ g/ml
MDCK II	57 $\mu$ g/ml	43 $\mu$ g/ml	-	23 $\mu$ g/ml

Табл. 4. Стойности на  $IC_{50}$  в  $\mu$ g/ml на съответните растителни екстракти за тестваните клетъчни линии. Липсват данни в случаите, в които концентрации  $IC_{50}$  не са достигнати в рамките на изследването.



Фиг. 15. Цитотоксичност на екстракти от *I. oculus-christi*, обогатени с лактони (А, В) и флавоноиди и фенолни киселини (С, D) върху клетъчни линии MDCK (сиво) и A549 (черно). Изследване с кристал виолет на 24 (А, С) и 48 (В, D) час от третирането.

### – Анализ на клетъчната морфология

Отчетеното спектрофотометрично намаляване на броя на клетките след третиране със сесквитерпенови лактони беше потвърдено и от микроскопското наблюдение на монослоевите. Причинените от този екстракт промени в клетъчната морфология би могло да се интерпретират като следствие от високи нива на стрес. Морфологията на A549 клетките беше силно променена - откриваха се клетки с намален обем, светла цитоплазма, много интензивно оцветени ядра, а също и голямо количество остатъци от мъртви клетки. Подобна беше находката и на втория ден от експеримента. Сесквитерпеновите лактони слабо засегнаха морфологията на MDCK клетки и клетъчните контакти бяха запазени на първия ден след третиране. На втория ден, обаче, се наблюдаваха вакуоли около ядрата на клетките и в близост до клетъчната периферия, както и промени в клетъчната форма, което е индикация за изменения в цитоскелета.

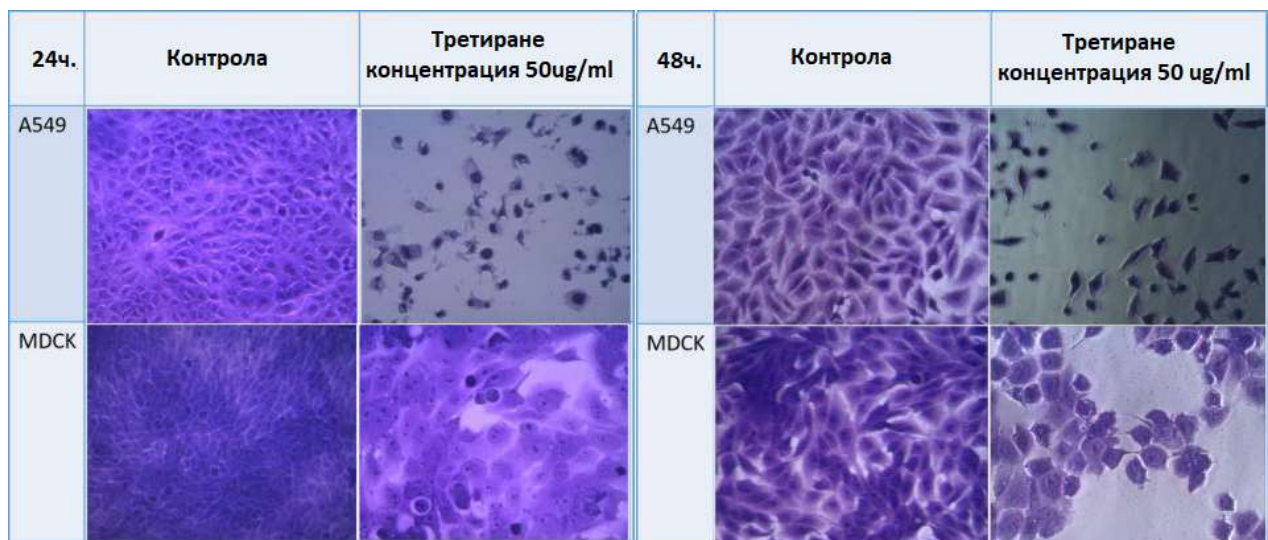
По-слабата цитотоксичност на полифенолите беше потвърдена и от морфологичния анализ на клетките, третирани с тези вещества. Нераковата линия не показва значителни морфологични промени на първия ден от третирането при всички концентрации. При раковите клетки също нямаше значителни промени в морфологията на преживелите клетки, въпреки че ясно се наблюдаваше редуцирането на броя на клетките в сравнение с контролата.

На втория ден от експеримента, при третиране със субтоксична концентрация от 10  $\mu\text{g/ml}$  полифеноли A549 напълно възстановиха своята морфология и дори се наблюдаваха клетки в митоза, което показва, че тази концентрация е безвредна за тях и те продължават да се делят. От друга страна при пробите, третирани с концентрации над  $\text{IC}_{50}$  бяха отчетени съществени изменения във формата на клетките и интензивността на цитоплазменото и ядреното оцветяване. Наличието на много клетки с намален обем и остатъците от мъртви клетки между тях, бяха индикация за протекло интензивно отмиране на клетките.

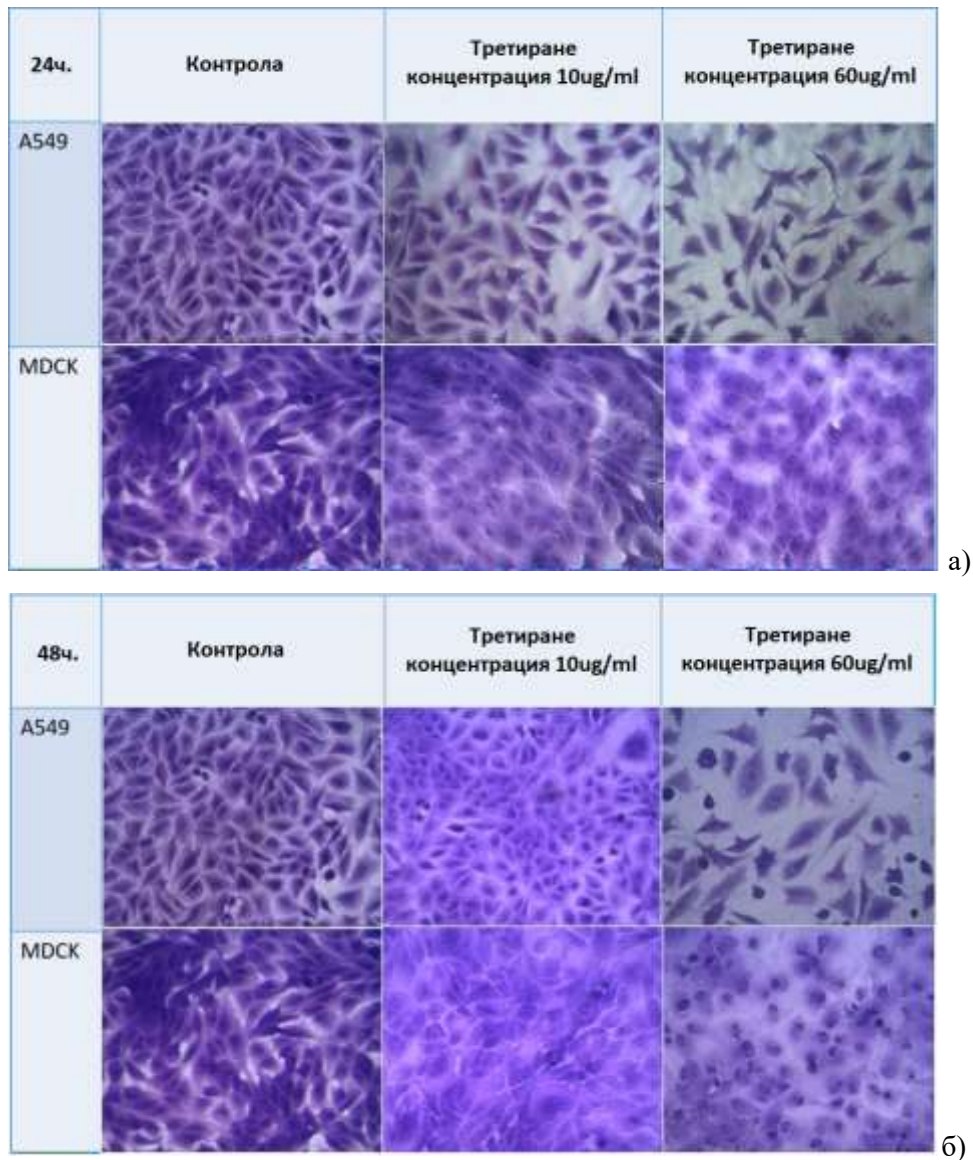
Морфологичните промени на клетки MDCK се запазиха и на 48 час от третирането при всички приложени концентрации. След прилагане на най-високата концентрация се изявиха и други промени в клетките - пикнотични ядра, бледа и вакуоализирана цитоплазма. Тези промени са типични за клетки, които претърпяват

клетъчен стрес и би могло да са обратими, при положение, че се премахнат стресовите фактори.

Изследванията ни съвпадат с литературните данни за противораковото действие на сесквитерпеновите лактони. Екстрактът, обогатен със сесквитерпенови лактони беше по-цитотоксичен към раковата клетъчна линия. Екстрактът, съдържащ полифеноли (фенолни киселини и флавоноиди) беше цитотоксичен само при прилагане на по-високи концентрации и при по-продължително третиране без значителни различия в действието към ракови и неракови клетки. Избирането на определен сесквитерпен лактон или комбинация от лактон и полифенол може да бъде обещаваща основа за бъдещи изследвания на механизма на антитуморното действие на растителните екстракти.



Фиг. 16. Морфологични промени в клетки A549 и MDCK след третиране с екстракт от *I. oculus-christi*, обогатен на сесквитерпенови лактони. Оцветяване с кристал виолет. Увеличение: 400x.



Фиг. 17. Морфологични промени в клетки A549 и MDCK на 24. час а) и 48. час б) след третиране с екстракт от *I. oculus-christi*, обогатен на полифеноли. Оцветяване с кристал виолет. Увеличение: 400х.

## 2.2. Изследване на влиянието на екстракти от *I. oculus-christi* върху моделни мембранны системи, нативни клетъчни мембрани и върху актиновия цитоскелет.

Екстрактът от *I. oculus-christi*, обогатен с флавоноидни гликозиди и този, обогатен с фенолни киселини показаха много обещаваща активност според изследването за цитотоксичност и морфологичния анализ. Флавоноидните гликозиди слабо повлияха нормалните клетъчни линии, докато беше отчетена значителна цитотоксичност върху раковите клетки при третиране с по-високите концентрации. Фенолните киселини бяха значително по-токсични към клетки HepG<sub>2</sub> в сравнение с

останалите клетъчни линии. Наблюдавахме промени в морфологията, които са характерни за увреждания в клетъчният граничен комплекс и плазмената мембрана. За да окаже влияние върху жизнеността на клетката и клетъчните функции, определен агент трябва да проникне през или да взаимодейства с плазмената мембрана. Биологично активните растителни вещества, с амфибилна или хидрофобна структура е вероятно да повлияят върху структурната организация на липидите в мембрания бислой и неговия микровискозитет. Взаимодействието между веществата с растителен произход и плазмената мембрана се предполага, че е механизъм, на който се дължат различните ефекти на фитохимикалите. Прието е, че резултатът от взаимодействието на полифенолните молекули с биологичните или с моделните мембрани зависи от свойствата на полифенола и е възможно да бъде свързване на границата между липидната (неполярна) и водната (полярна) среда, или навлизане в неполярната вътрешност на мембраната.

### **2.2.1. Изследване на подредеността на мембраните на клетки MDCK и A549, белязани с Лаурдан и di-4-ANEPPDHQ. Влияние на фитохимикалите върху актиновия цитоскелет.**

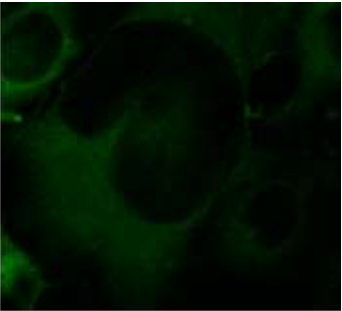
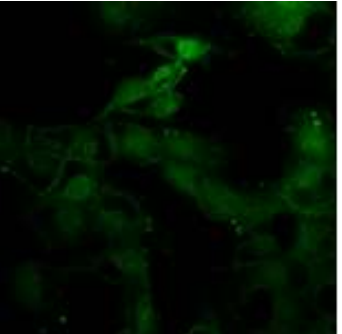
Изследвахме ефекта на избраните от нас екстракти от *I. oculus-christi* върху подредеността на липидите в плазмената мембрана на две отделни еукариотни клетъчни линии, съответно с раков (A549) и нераков произход (MDCK).

За осъществяване на целта - визуализиране на мембранните домени - избрахме две флуоресцентни сонди, а именно Лаурдан и di-4-ANEPPDHQ. Тези сонди различават промени във фазовото състояние на мембраната. Спектъра им на излъчване се отмества поради промяна в диполния момент на сондата. Такива сонди, интегрирани в бислоя и чувствителни към полярността на своето липидно обкръжение ни дават информация за подредеността на мембраната. Отчитането на промяната в полярността на локалния липиден състав разкрива местата на динамичните латерални нехомогенности в мембраната и ни помага да визуализираме мембранните домени. Owen и сътрудници [34] описват флуоресцентна микроскопска техника за визуализиране на клетки, белязани с Лаурдан и di-4-ANEPPDHQ. За целите на нашите изследвания ние оптимизирахме и протокол за оцветяване на клетки с Лаурдан според Wheeler и сътрудници [35]. Значителен недостатък на Лаурдан, е че той се възбужда при дължина на вълната  $\sim 400$  nm, което го прави изключително подходящ за изследване с двуфотонен микроскоп ( $\sim 800$  nm). Направените от нас модификации на метода ни

позволиха да осъществим визуализацията на белязаните с Лаурдан домени посредством стандартен конфокален микроскоп.

### 2.2.1.1. Изследване на подредеността на клетъчни мембрани с Лаурдан.

Известно е, че адхезивните комплекси, свързани с цитоскелета са подредени области от мембраната. Те включват както междуклетъчните комплекси, така и комплексите между клетките и извънклетъчния матрикс, като адхерентните контакти и фокалните адхезивни контакти. Според нашите очаквания, контролните проби от клетъчна линия MDCK показаха области с по-подредена мембрана в зоните около клетъчните контакти, характерни за тези клетки, в периферията на клетките, както и в базалната им повърхност, с която влизат в контакт с повърхността, върху която са култивирани. В контролните клетки A549 наблюдавахме, че интензитета на флуоресценция от мембранните области в течно-неподредено фазово състояние е по-голям от този в течно-подредено фазово състояние, като сигналът предимно идва от цитоплазмата на клетката.

Общо изображение	бражение, отговарящо на зитета на флуоресценция от бранните области в Lo фаза	бражение, отговарящо на зитета на флуоресценция от бранните области в Ld фаза	
			клетки A549
			клетки MDCK



Фиг. 18. Микрофотографии на клетки от клетъчни линии A549 и MDCK, на които са визуализирани по-подредените мембранни домени (в синьо) и неподредените области от мембраната (в зелено), както и общо изображение, в което са включени двата сигнала.

#### **2.2.1.2. Изследване на подредеността на клетъчните мембрани с di-4-ANEPPDHQ. Ефект на растителните екстракти върху организацията на актиновия цитоскелет.**

Поради спектралните характеристики на чувствителната към полярността на средата сонда di-4-ANEPPDHQ, при визуализацията под микроскоп се постига по-добър контраст между флуоресценцията от мембранните области в различно фазово състояние (*Ld* или *Lo*) и съответно – по-добри изображения в сравнение с оцветяването с Лаурдан. Освен това di-4-ANEPPDHQ при има по-нисък фон сигнал от цитозола, което улеснява разграничаването на плазмената мембрана и други вътреклетъчни мембранни структури.

Жизнеността и правилното функциониране на клетката зависи от нормалната структура и функция на плазмената мембрана и свързания с нея цитоскелет. Взаимодействието между плазмената мембрана и цитоскелета е от съществено значение за основни клетъчни процеси като ендоцитоза, формиране на междуклетъчни контакти, поддържането на функционална морфология на клетката и др. Начинът, по който взаимодействат мембранните липиди и белтъци с цитоскелета може да бъде повлиян от промяна във флуидитета на мембраната.

Рафтовете участват в сигнализацията между цитоскелета и извънклетъчния матрикс, което причинява реорганизация на цитоскелета, необходимо за отделяне и миграция на някои типове клетки и контракция при други. Активното взаимодействие между рафтовете и подлежащия цитоскелет модулира много от характеристиките на функционирането на еукариотните клетки и адаптацията им към промените в околната среда.

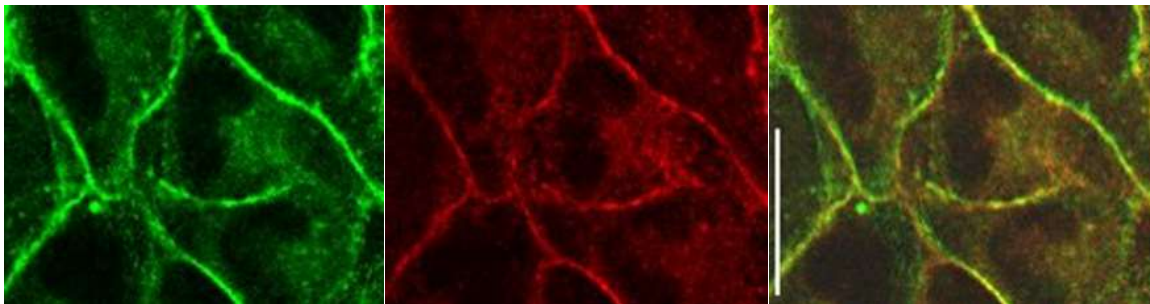
- **Визуализиране чрез конфокална микроскопия на подредеността на липидите в клетъчната плазмена мембрана, белязана с флуоресцентната сонда di-4-ANEPPDHQ.**

Поради присъщите на сондата свойства, нейният флуоресцентен емисионен спектър се определя от наличието на полярни молекули около нея. Молекулите на

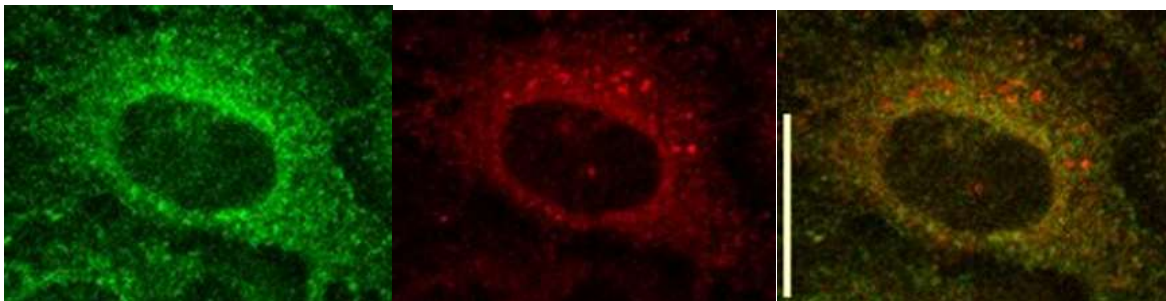
сондата се разпределят равномерно между двете фазови състояния на липидния бислой, но спектърът им на излъчване е различен при *Lo* и при *Ld* фазово състояние на средата. Молекулата на di-4-ANEPPDHQ се възбужда при облъчване с дължина на вълната 488 nm. Сондата излъчва с пик в интензитета на флуоресценцията при ~ 560nm (обозначен със зелен цвят във фиг. 19, 20. и 21.), когато се намира сред липиди в *Lo* фазово състояние; и ~ 620 nm (обозначен с червен цвят във фиг. 19., 20. и 21.), когато се намира сред липиди в *Ld* фазово състояние на средата. Скалата в общата микрография се равнява на 25µm.

– Контролни клетки

Изображения на контролни клетки са представени на фиг. 19. Клетъчна линия **MDCK** произхожда от неракова тъкан (бъбречен епител). Тези клетки поляризират, формират добре изразени плътни контакти и притежават богата на рафтове апикална плазмена мембрана, изпълнена с микровили. На микрографиите от фиг. 19. се наблюдава висок интензитет на флуоресценцията в зелен цвят (*Lo* фаза) върху добре очертани плазмени мембрани. Това може да бъде обяснено с наличието на множество междуклетъчни контакти, Тези контакти притежават места за междуклетъчно свързване и за залавяне на актиновия цитоскелет за плазмената мембрана.



Фиг. 19. а)

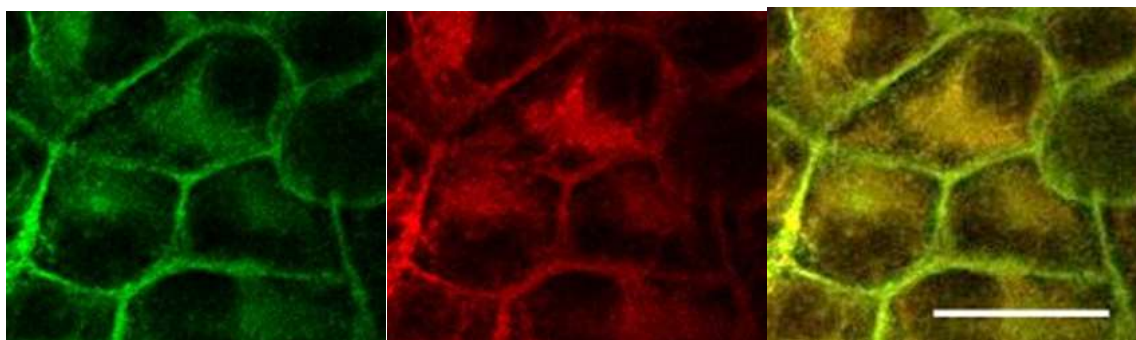


Фиг. 19 б)

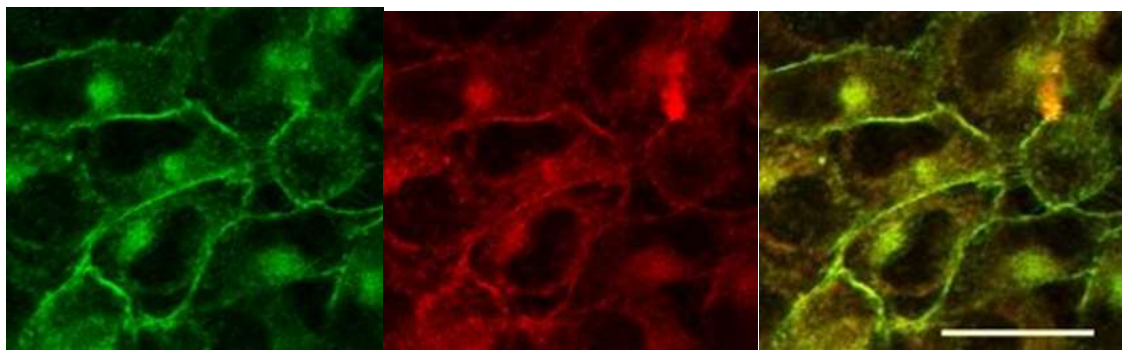
Фиг. 19. Контролни клетки MDCK а) и A549 б), оцветени с di-4-ANEPPDHQ. *Lo* фазовото състояние на мембраната е представено със зелен цвят, а *Ld* - с червен. Скалата се равнява на 25µm.

Клетъчна линия A549 произлиза от (недребноклетъчен) белодробен карцином. Цитоплазмата на тези клетки е богата на органели, ламеларни телца и се извършва активна цитоза. Флуоресценцията от di-4-ANEPPDHQ беше разпределена предимно в цитоплазмата.

– Клетки, третирани с екстракт, обогатен на флавоноидни гликозиди.



Фиг. 20. а)



Фиг. 20. б)

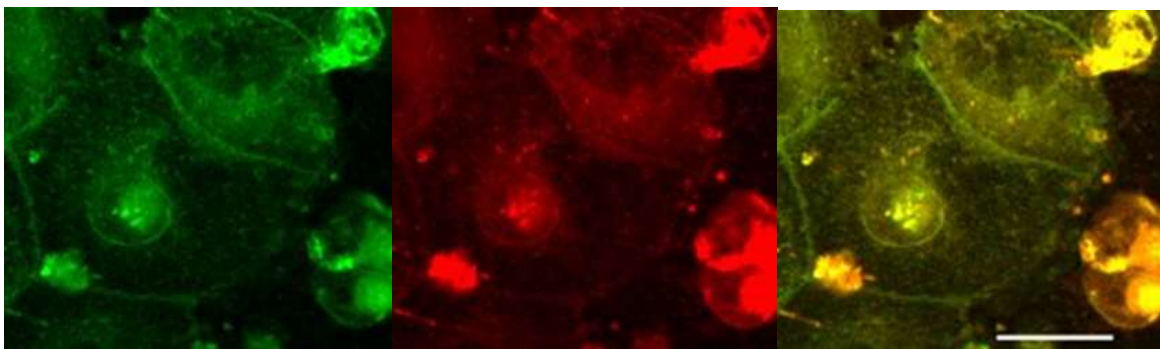
Фиг. 20. Клетки MDCK а) и A549 б), третирани с флавоноидни гликозиди и оцветени с di-4-ANEPPDHQ. *Lo* фазовото състояние на мембраната е представено със зелен цвят, а *Ld* - с червен. Скалата се равнява на 25µm.

Изображенията на клетки, третирани с флавоноидни гликозиди са представени на фиг. 20. След третирането при клетки MDCK отбелязахме по-окръглена форма на клетките, в сравнение с контролите, което вероятно е следствие от загуба на междуклетъчни контакти. Забелязваше се по-интензивна флуоресценция от цитоплазмата. След третиране на клетки A549 с флавоноидни гликозиди наблюдавахме

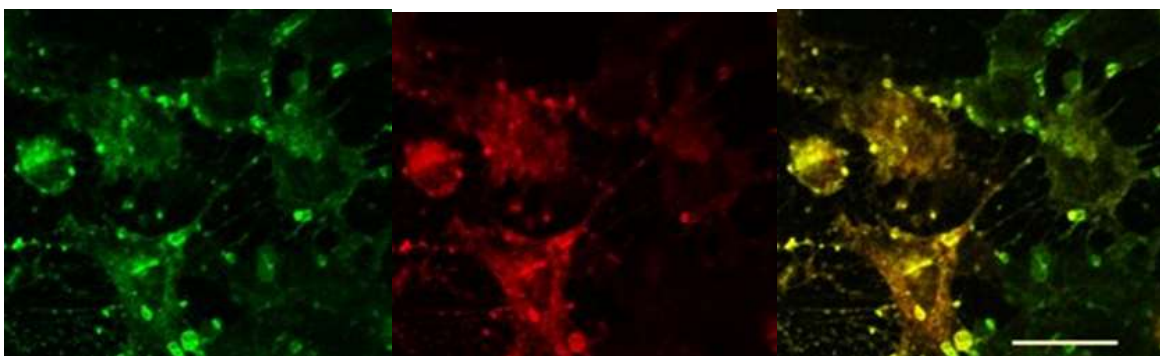
клетки с изразена флуоресценция от цитоплазмената мембрана за разлика от контролите, където сигналът от плазмалемата не беше така отчетлив. Цитоплазменият сигнал от di-4-ANEPPDHQ беше плътно концентриран по специфичен начин в област, разположена до ядрото.

– Клетки, третирани с екстракт, обогатен на фенолни киселини

Изображенията на клетките, третирани с фенолни киселини са представени на фиг. 21. В резултат на третирането клетки MDCK придобиха по-елипсовидна форма, в сравнение с контролите. Областта, заемана от плазмените мембрани изглеждаше изтънена и се наблюдаваха мъртви клетки. Екстрактът значително увреди раковите клетки, където регистрирахме морфологични промени, масово формиране на везикули и клетъчна смърт, предизвикани от тези вещества (фенолните киселини).



Фиг. 21. а)



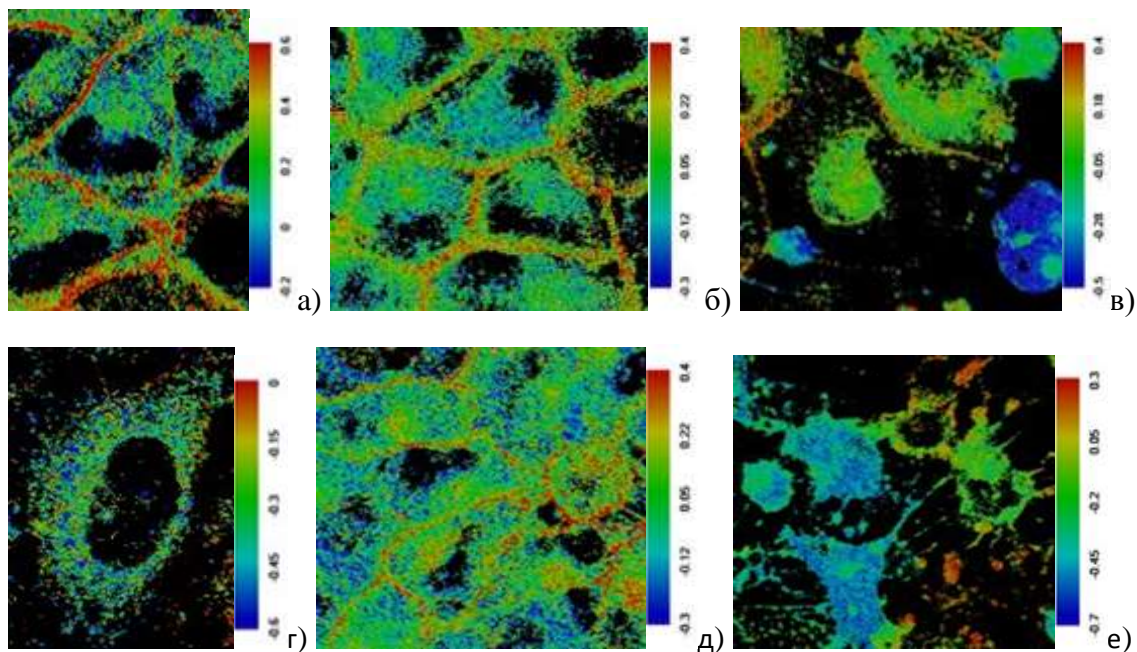
Фиг. 21. б)

Фиг. 21. Клетки MDCK а) и A549 б), третирани с фенолни киселини и оцветени с di-4-ANEPPDHQ. *Lo* фазовото състояние на мембраната е представено със зелен цвят, а *Ld* - с червен. Скалата се равнява на 25µm.

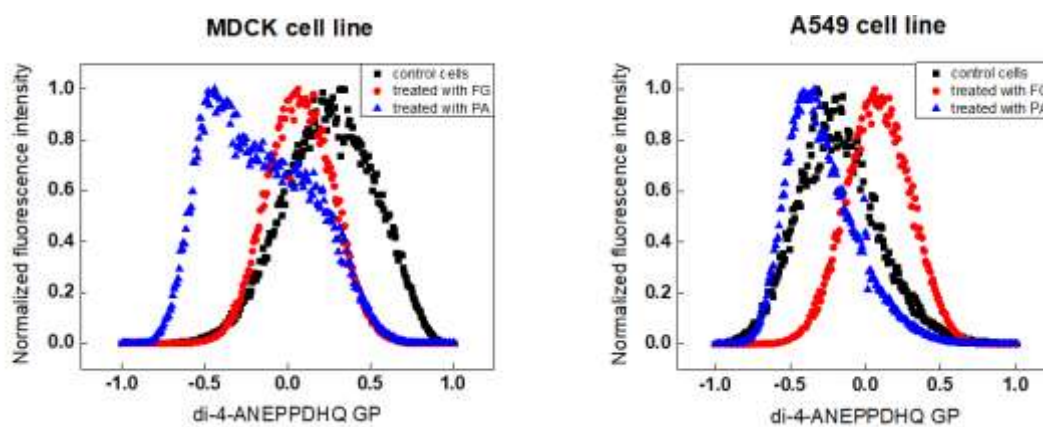
- **Изготвяне на GP изображение и хистограми на GP стойностите**

Изместването в емисионния спектър на di-4-ANEPPDHQ може да бъде околичествено чрез анализ на общата поляризация. Тази функция - Общата поляризация (GP) представлява нормализирания интензитет на флуоресценцията. За пресмятане на GP – стойностите се използват спектралните канали, които отговарят на *Lo* и *Ld* фазовото състояние. Околичествените данни от обработените флуоресцентни изображения са представени на фиг. 22. и табл. 5.

GP - изображенията на контролните и третираните клетки са представени на фиг. 22. Цветовете в синята гама съответстват на области с по-флуидно състояние на липидите, а тези от червената гама - на области, намиращи се в по-подредената фаза. Генерираните от софтуера хистограми от GP- изображенията са обобщени във фиг. 23. Контролните проби от MDCK клетките имаха по-високи GP-стойности в сравнение с контролите на A549, което означава, че MDCK клетките имат по-подредени мембрани – потвърждение на резултата, който наблюдавахме при контролните клетки, оцветени с Лаурдан. MDCK клетките, третирани с флавоноидни гликозиди (фиг. 22. б) и с фенолни киселини (фиг. 22. в) имаха по-флуидни мембрани, в сравнение с контролите (фиг. 22. а). Фенолните киселини имаха по-силен ефект, което може да бъде видяно околичествено на фиг. 22. и табл. 5. Различни бяха резултатите след третиране на клетки A549. Екстрактът, съдържащ флавоноидни гликозиди имаше подреждащ ефект върху клетките A549 (фиг. 22. д) - обратното на резултата, получен при нераковите клетки, докато екстрактът с фенолни киселини флуидизира мембраните на раковите клетки (фиг. 22. е). Подобни ефекти са наблюдавани при изследването на miltefosine - амфипатична молекула, клинично използвана при лечението на лейшманиоза и при ракови заболявания. Върху моделни мембранни системи miltefosine има по-голямо въздействие върху моделните мембрани на ракови клетки, изградени от дипалмитоил фосфатидилсерин, като повишава подредеността на липидите в мембрания бислой [36]. Изследвани са също така съединения с потенциален антитуморен ефект, изолирани от различни видове растения, като (-)-epigallocatechin gallate, genistein, arigenin, resveratrol. Показано е, че имат по-голям подреждащ ефект върху по-флуидни моделни мембрани, представляващи модел на мембраните на туморни клетки [37]. Нашите изследвания сравняват действието на амфипатични молекули върху ракова и неракова клетъчна линия.



Фиг. 22. GP- изображения, получени след обработване на флуоресцентните микрографии на клетки MDCK а), б), в) и A 549 г), д), е). Контроли а), г); клетки, третирани с флавоноидни гликозиди б), д); клетки, третирани с фенолни киселини в), е).



Фиг. 23. Обобщени данни за общата поляризация на di-4-ANEPPDHQ. Хистограми, получени с програмите Cell tool и Origin от GP изображенията на контролни и третирани клетки от клетъчни линии MDCK и A 549.

Клетки	MDCK – GPмаксимум	A549 – GP максимум
Контрола	0.331	-0.323
Третирани с 200 $\mu\text{g/ml}$ FG	0.063	0.047
Третирани с 200 $\mu\text{g/ml}$ PA	-0.441	-0.338

Табл. 5. Стойности на пиковите в хистограмите, получени от GP- изображенията на контролни и третирани клетки от клетъчни линии MDCK и A 549.

- **Изследване на актиновия цитоскелет.**

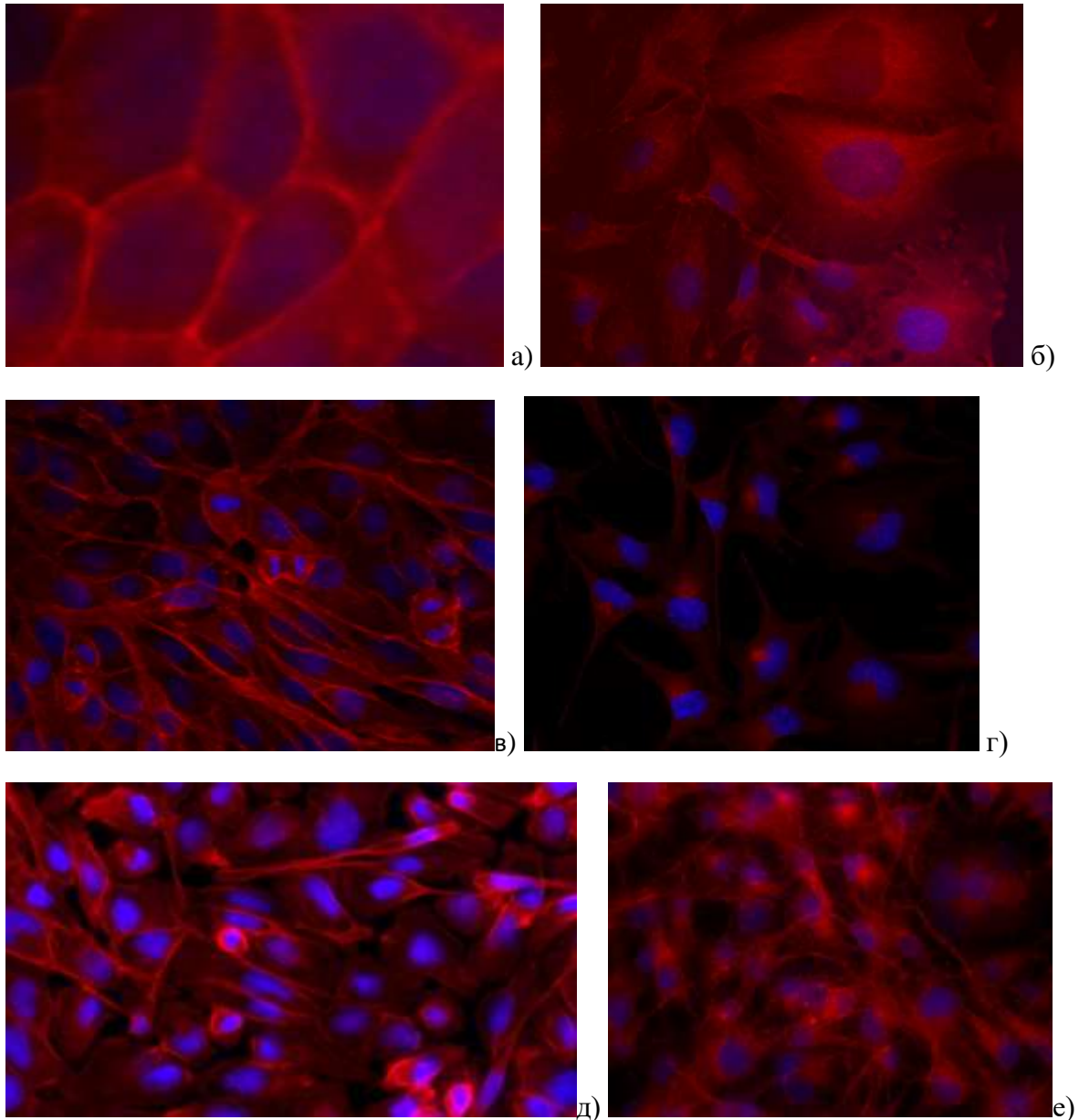
Изследвахме влиянието на флавоноидните гликозиди и фенолните киселини от *I. oculus-christi* върху организацията на актиновия цитоскелет на клетки MDCK и A549. Използвахме TRITC (tetramethylrhodamineisothiocyanate) фалоидин за визуализиране на актиновите филаменти. Поради високата специфичност на фалоидина да се свързва с актиновите филаменти, той се използва при белязването на F-актина.

Двете клетъчни линии, използвани за това изследване са епителни. Морфологията на контролните клетки беше нормална, характерна за съответната клетъчна линия, с конfluентен монослой и активно клетъчно делене. При клетки MDCK (фиг. 24. а) флуоресцентният сигнал беше с най-голям интензитет в периферията на клетката и областта на клетъчната мембрана. Те образуват множество адхезивни контакти и плътни контакти, които осигуряват разделянето на плазмената мембрана на базолатерална и апикална област и съответно поляризацията на клетките. При клетки A549 (фиг. 24. б) наблюдавахме правилно структуриран актинов цитоскелет с изразени стрес фибрили.

След третиране с флавоноидни гликозиди, клетки MDCK запазиха конfluентен монослой и продължиха да се делят активно. Флуоресцентния сигнал беше най-интензивен в областта на клетъчните мембрани, както при контролите (фиг. 24. в). При другата клетъчна линия активността на флавоноидните гликозиди доведе до намаляване на конfluентността на монослоя (фиг. 24. г). Това е в съответствие с нашите резултати за по-високата цитотоксичност на флавоноидните гликозиди към раковите клетки, в сравнение с MDCK. Характерно за белязаните с TRITC-фалоидин клетки A549 беше, че наблюдавахме флуоресценцията от цитоплазмата плътно концентрирана по специфичен начин в определена област в непосредствена близост до ядрото, подобно на резултатите при същия тип клетки след оцветяване с di-4-ANEPPDHQ - анализът на общата поляризация доказа, че тази област е по-подредена.

След третиране с екстракт от фенолни киселини интензитетът на сигнала от клетки MDCK беше намален. Актиновите филаменти като цяло бяха запазени в областта на мембраната, където се наблюдаваха и агрегати от актин. Флуоресценцията от F-актина на клетки A549 намаля след третиране с фенолни киселини. Специфични за тези проби бяха разклонена актинова мрежа и силно изразени стрес фибрили. Като

цяло изследваните екстракти проявиха по-слабо влияние върху актиновия цитоскелет на клетките от нераковата клетъчна линия. Раковата клетъчна линия показва голяма чувствителност към екстрактите, като наблюдавахме различни модели на дезорганизация на актиновия цитоскелет при третиране с различните екстракти. Отделни елементи от вида на актиновата мрежа след третиранията с различни екстракти са би могло да бъдат интерпретирани като резултат от активирането на специфични сигнални пътища.



Фиг. 24. Флуоресцентни изображения на клетки MDCK а), в), д) и А 549 б), г), е). Оцветяване на актинов цитоскелет с TRITC-фалоидин (червено) и на ядра с DAPI (синьо). Контролни клетки а), б); клетки, третирани с флавоноидни гликозиди в), г); клетки, третирани с фенолни киселини д), е).



Тестваните полифенолни вещества успяха да предизвикат изменения в организацията на плазмената мембрана и на актиновия цитоскелет и в двете клетъчни линии. Флавоноидните гликозиди предизвикаха подреждане на мембраните на клетки A549 и флуидизиране на мембраните на MDCK. Фенолните киселини флуидизираха мембраните и на двете клетъчни линии. След третиране с двата вида полифенолни съединения наблюдавахме различни модели на реорганизация на актина за всяка от двете клетъчни линии. Актиновия цитоскелет на раковите клетки A549 беше по-засегнат, докато промените в MDCK бяха умерени.

Предполагаме, че влиянието на флавоноидните гликозиди и фенолните киселини върху флуидитета на мембраните променя афинитета на протеините, отговорни за свързването между мембраната и актина и по този начин е възможно да въздейства върху различни клетъчни функции, включително междуклетъчните взаимодействия и сигнализация. Променения мембранен флуидитет в комбинация с реорганизация на актиновия цитоскелет би могло да ограничи злокачествените прояви на някои тумори.

### **2.2.2. Изследване на антиоксидантния капацитет на фенолните киселини и флавоноидните гликозиди от *I. oculus-christi* и тяхното влияние върху флуидитета на липидния бислой в моделни мембранни системи.**

Физиологичната флуидност на клетъчната мембрана се свързва с функцията ѝ на избирателно пропусклива бариера и с правилното протичане на различни процеси, свързани с мембраната. Един от възможните механизми, чрез който оксидативния стрес нарушава нормалното функциониране на клетката е окислението на липидите в мембранныя бислой и увреждането на плазмената мембрана като следствие от това.

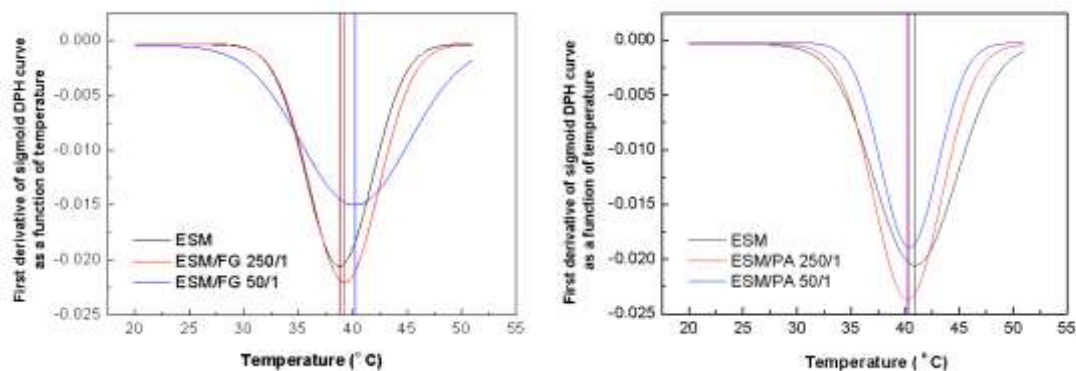
Ние проверихме потенциала на флавоноидните гликозиди и фенолните киселини, екстрахирани от *I. oculus-christi* да влияят върху латералната организация на плазмената мембрана и да проявяват антиоксидантни свойства. Използвахме моделни и клетъчни мембрани и флуоресцентни методи на изследване.

Действието на полифенолите върху латералната организация на мембранните липиди беше проследено чрез DPH- и Laurdan- флуоресцентна спектроскопия. Използвахме TEMPO-DPH флуоресцентна спектроскопия (методът на гасенето на DPH от TEMPO) за да сравним големината на фракцията от рафт-подобни мембранни домени в липозоми при наличието и без наличието на добавени полифеноли.

- **Ефект на флавоноидните гликозиди и фенолните киселини върху температурата на фазов преход на сфингомиелина.**

Сфинголипидите са клас от мембранни липиди, които имат дълги наситени въглеродородни (мастнокиселинни) вериги. За нашите експерименти използвахме яйчен сфингомиелин като най-подходящ сфинголипид за състава на мембрани, моделиращи клетъчни мембрани. Ацилните вериги на сфингомиелина са плътно пакетирани, което е основен фактор за формирането на латерални микродомени в биологичните мембрани. Молекулите на сфингомиелина обикновено имат формата на цилиндър, но при много от тях дължината на двете хидрофобни вериги се различава значително. Сфингомиелина има по-висока температура на фазов преход в сравнение с  $T_m$  на други фосфолипиди с подобна структура и е в границите на температурния диапазон на физиологичната температура.

Чрез ДРН-поляризационната спектроскопия ние изследвахме липозоми, получени от контролни смеси от сфингомиелин и проби с добавен екстракт от флавоноидни гликозиди в различни съотношения към липидните молекули. Изчислихме ДРН-анизотропията в широк температурен диапазон с цел да регистрираме фазовия преход на сфингомиелина и ефектът на флавоноидните гликозиди. Получихме типична сигмоидална крива, която отговаря на фазов преход от вида  $S_o - L_d$ . За по-добра визуализация сме представили първата производна от сигмоидната крива като функция на температурата. Флавоноидните гликозиди предизвикаха повишаване на температурата на фазовия преход на сфингомиелина, което е показател за повишена подреденост на бислоя. Ефектът беше по-изявен с повишаване на концентрацията. Освен повишаване на температурата на фазовия преход, също така наблюдавахме дозозависимо увеличаване на ширината на сигмоидната крива. По-широка сигмоидна крива означава по-широк температурен диапазон, в който ко-съществуват двете фази ( $L_o$  и  $L_d$ ) в липидната бислоя (фиг. 25. а).



Фиг. 25.

а)

б)

Фиг. 25. DPH - поляризационна спектроскопия. Ефект на FG а) и PA б) върху флуидитета на липидите в липозоми от сфингомиелин.

Използвахме същата експериментална схема за да изследваме и екстракта, обогатен с фенолни киселини. Резултатите показаха, че тези полифенолни вещества флуидизират бислоя. Температурата на топене на сфингомиелина беше по-ниска в сравнение с контролата (фиг. 25. б). Пробата с липидна смес в комбинация с екстракт в съотношение 250/1 имаше малко по-ниска температура на топене ( $T_m$ ) в сравнение с пробата с по-висока полифенолна концентрация (съотношение на липид към полифенол 50/1). В същото време ширината на сигмоидната крива намаля заедно с повишаването на концентрацията на екстракта.

Като резултат от тези експерименти може да се заключи, че флавоноидните гликозиди причиниха концентрационно-зависимо повишаване на подредеността на липидите и в същото време увеличаване на (ширината на) температурния диапазон на прехода. Фенолните киселини промениха температурата на фазовия преход в по-малка степен в сравнение с флавоноидните гликозиди и имаха обратният ефект, а ширината на сигмоидалната крива намаля с увеличаване на концентрацията на екстракта.

- **Ефект на флавоноидните гликозиди и фенолните киселини върху флуидитета на липидите в липозоми, модел на клетъчните рафтове.**

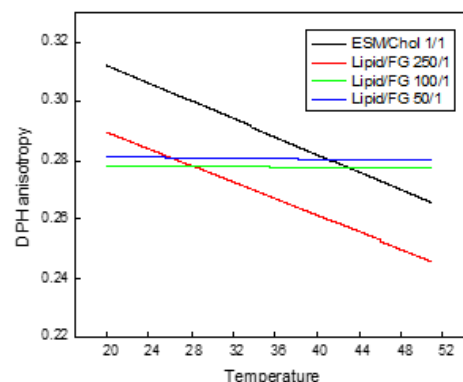
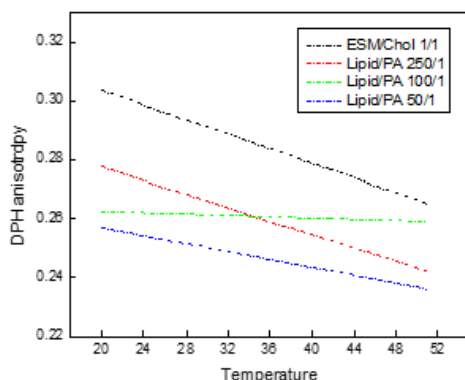
Добавянето на 50mol% холестерол към липидната смес от сфингомиелин значително повишава параметъра на подреденост на липидния бислой на липозомите и елиминира фазовия преход  $L\beta$ - $L_d$  - мембраната е изцяло в течно-подредено фазово

състояние (L<sub>o</sub>). Високата степен на подреденост се дължи на силния афинитет на холестерола към сфингомиелина.

Проведохме спектrophотометрични изследвания на контролни проби с везикули, изградени от сфингомиелин и холестерол в съотношение 1:1 (модел на липидни рафтове) и проби с различни концентрации на добавени полифеноли. Изследвахме ефекта на екстрактите върху флуидитета на мембранните липиди чрез две флуоресцентни сонди, локализирани на различна дълбочина в плазмената мембрана/липидния бислой - именно DPH и Laurdan.

- **DPH поляризационна спектроскопия**

В контролните проби наблюдавахме намаляване на подредеността на липидите успоредно с увеличаването на температурата, според нашите очаквания. Добавянето на полифеноли към липидната смес предизвика флуидизиране на бислоя. Активността на фенолните киселини беше по-силна и в същото време те намалиха ефекта от промяната на температурата (фиг. 26. а). Подредеността на липидите беше най-слабо зависима от температурните промени при съотношение на липиди към полифеноли 100/1 и за двата полифенолни екстракта. Имаше съвсем малки разлики в подредеността на липидите в бислоя за пробите с флавоноидни гликозиди в съотношение липиди/полифеноли 100/1 и 50/1, което предполага, че е достигната прагова концентрация на този екстракт (фиг. 26. б).



Фиг. 26.

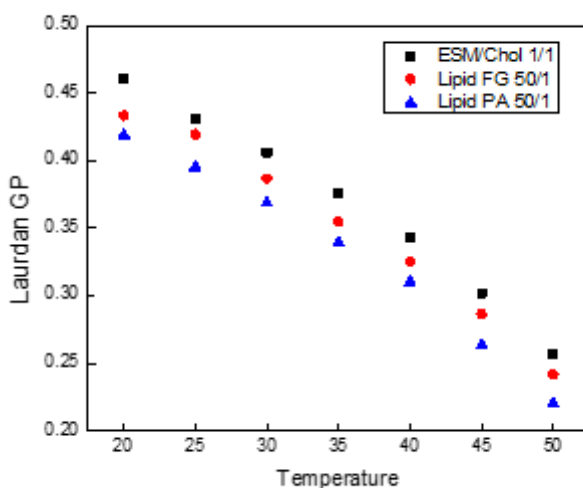
а)

б)

Фиг. 26. DPH - поляризационна спектроскопия. Ефект на PA а) и FG б) върху подредеността на липидите в липозоми от сфингомиелин и холестерол в съотношение 1/1.

- **Лаурдан - флуоресцентна спектроскопия**

Извършихме Лаурдан-флуоресцентна спектроскопия с липозоми от липидни смеси със състав ESM/Chol (1/1) и същите екстракти, в същите концентрации, както при DPH-поляризационната спектроскопия. Нашите резултати показаха че полифенолите причиняват понижаване на стойностите на общата поляризация като функция от температурата, което означава повишаване на флуидитета и отново фенолните киселини бяха по-активни (фиг. 27.). Резултатите от експериментите с Лаурдан съвпадат с тези, които получихме с другата молекулна сонда (DPH).

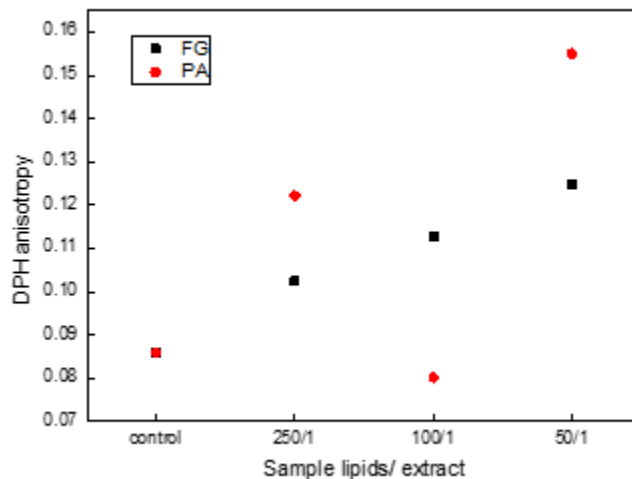


Фиг. 27. Лаурдан - флуоресцентна спектроскопия. Ефект на PA и FG върху подредеността на липидите в липозоми от сфингомиелин и холестерол в съотношение 1/1.

- **Ефект на флавоноидните гликозиди и фенолните киселини върху подредеността на мембраните в липозоми, модел на течно-неподреденото фазово състояние.**

Липидни смеси от ненаситени липиди се използват като модел за по-флуидния липиден матрикс, сред който са разположени рафтовете в биологичните мембрани. Най-разпространеният ненаситен липид във външният монослой на клетъчната плазмена мембрана е фосфатидилхолина. Използвахме яйчен фосфатидилхолин за нашите моделни системи. Изчислихме параметъра на подреденост на проби с чист

фосфатидилхолин и проби с добавени флавоноидни гликозиди или фенолни киселини при физиологична температура (37°C). Резултатите показаха, че полифенолите повишават параметъра на подреденост на липидите в бислоя. Фенолните киселини имаха по-силен ефект при най-високите използвани концентрации на екстракта (фиг. 28.).



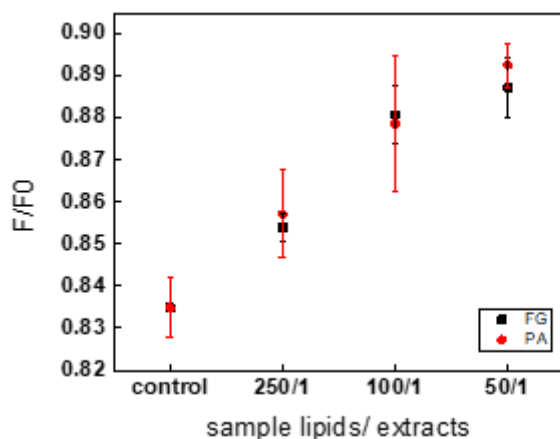
Фиг. 28. DPH - поляризационна спектроскопия. Ефект на PA и FG върху подредеността на липидите в липозоми от фосфатидилхолин.

- **Ефект на флавоноидните гликозиди и фенолните киселини върху относителната големина на рафт-фракцията в липозоми от трикомпонентни смеси (PC/SM/Chol).**

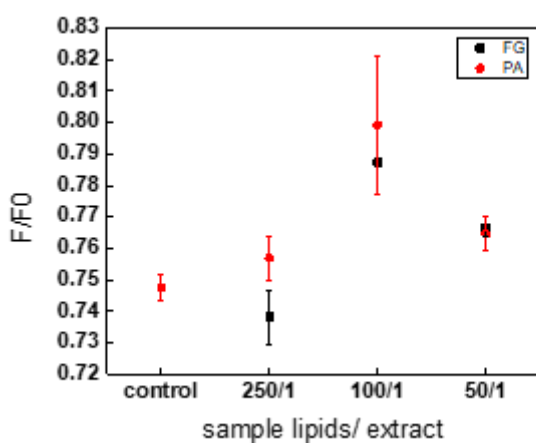
Липозомите от трикомпонентни смеси (фосфатидилхолин, сфингомиелин и холестерол) се използват като моделна система с която да се пресъздаде хетерогенността на биологичните мембрани и косъществувашите течно подредено и течно неподредено фазово състояние. Посредством TEMPO-DPH флуоресцентна спектроскопия (методът на гасене на DPH от TEMPO) ние определихме ефекта на полифенолните екстракти върху относителната големина на липидната рафт-фракция. В тази серия от експерименти използвахме три различни съотношения между фосфатидилхолин, холестерол и сфингомиелин, които са сравними със съотношенията в клетъчните мембрани на различни типове клетки. Рафт-домените в биологичните мембрани обикновено съдържат сфингомиелин и холестерол в съотношения от 1/1 до 2/1 в полза на сфингомиелина. Поради тази причина ние използвахме трикомпонентни

липидни смеси EPC/ESM/Chol в съотношения 40/40/20 (най-често срещано в клетъчната плазмена мембрана), 50/25/25 и 33/33/34 (при което съдържанието на холестерола е равно на това на фосфатидилхолина и сфингомиелина).

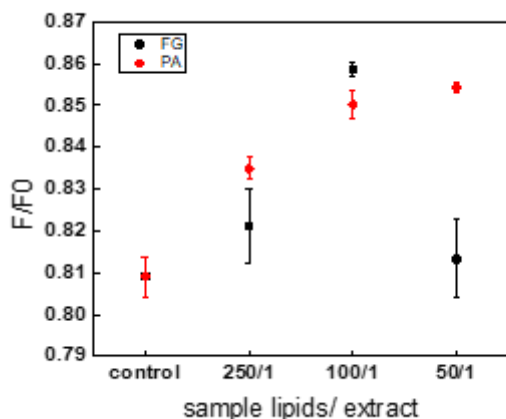
Добавянето на двата вида полифеноли причини зависимо от концентрацията повишаване на рафт-фракцията и в трите типа трикомпонентни липозоми. При най-ниската концентрация на холестерол (40/40/20) двете групи от полифеноли стимулираха образуването на рафтове в сравнима степен и не открихме значителна разлика в ефекта им (фиг. 29. а). При липозомите от втората трикомпонентна смес (50/25/25), най-голям ефект беше открит при съотношение на липиди към полифеноли 100/1 и за двата екстракта. Намаляване на рафт-фракцията наблюдавахме само при ниски концентрации на флавоноидни гликозиди (250/1) (фиг. 29. б).



Фиг. 29. а) EPC/ESM/Chol 40/40/20



Фиг. 29. б) EPC/ESM/Chol 50/25/25



Фиг. 29. в) EPC/ESM/Chol 33/33/34

Фиг. 29. TEMPO-DPH флуоресцентна спектроскопия. Влияние на FG и PA върху относителната големина на рафт фракцията в трикомпонентни смеси (EPC/ESM/Chol).

Най-значителна разлика в ефекта на фенолните киселини и флавоноидните гликозиди получихме при мембрани, изготвени от липидна смес със съотношение на липидите 33/33/34 (EPC/ESM/Chol), които имат най-високо съдържание на холестерол. Активността на фенолните киселини беше пряко зависима от тяхната концентрация в пробите, докато флавоноидните гликозиди достигнаха максималният си ефект при съотношение на липиди към полифеноли 100/1 (фиг. 29. в).

- **Антиоксидантни свойства на полифенолите, изследвани върху моделни мембрани от ненаситени полизахариди.**

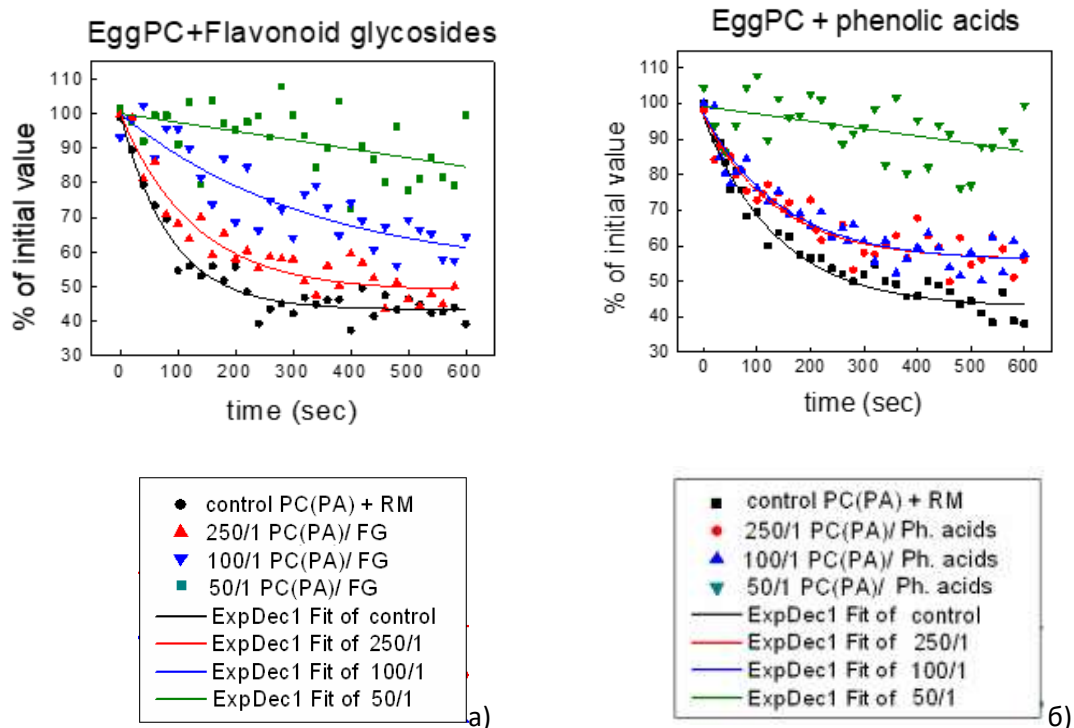
Доказано е, че полифенолите притежават антиоксидантен потенциал, като те са сред най-ефективните антиоксиданти с растителен произход [38]. Действат като донори на протони и електрони и могат да изменят кинетиката на липидната пероксидация на мембранните липиди посредством промяна в степента им на пакетирание и намаляване на мембрания флуидитет [39]. Тези промени могат да ограничат дифузията на свободните радикали и да прекратят реакцията на пероксидация [40]. По този начин антиоксидантите предпазват клетъчните мембрани от вредното въздействие на реактивните кислородни форми. Изследвахме капацитета на полифенолните екстракти да проявят антиоксидантно действие върху моделни мембрани. Ненаситените липиди, с тяхната голяма чувствителност към реактивността на свободните радикали са подходящ модел за изследване на антиоксидантната активност на фитохимикалите. Използвахме липозоми от фосфатидилхолин и цис-паринарна киселина за нашите експерименти. Наличието на множесво ненаситени двойни връзки и способността да флуоресцира правят паринарната киселина изключително чувствителна към окисление



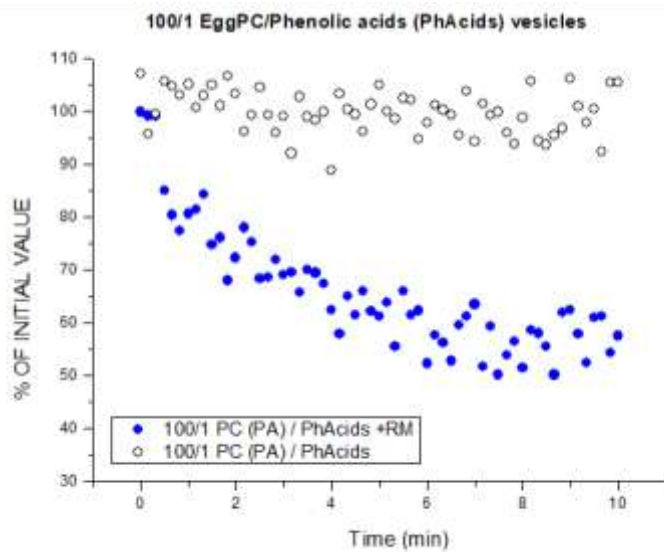
и подходяща за детекция чрез спектроскопия. Използвахме метода на гасенето на паринарната киселина от окисляваща реакционна смес като метод за определяне на антиоксидантните свойства на изследваните от нас полифенолни вещества.

Нашите резултати показаха, че контролните липозоми (без добавени полифеноли към липидната смес) са най-окислени. Наличието на полифеноли оказва значителен протективен ефект и намали близо четири пъти процента на окислените липиди в сравнение с контролите. При най-високата използвана концентрация на екстрактите беше запазена около 80% от първоначалната флуоресценция, като флавоноидните гликозиди имаха по-добър ефект. Открихме, че полифенолните екстракти проявяват антиоксидантно действие (Фиг. 30.). Тези резултати са в съответствие с нашите очаквания и литературните данни за антиоксидантния ефект на полифенолите. Според нашите данни флавоноидните гликозиди се проявиха като по-добри антиоксиданти в сравнение с фенолните киселини (фиг. 32).

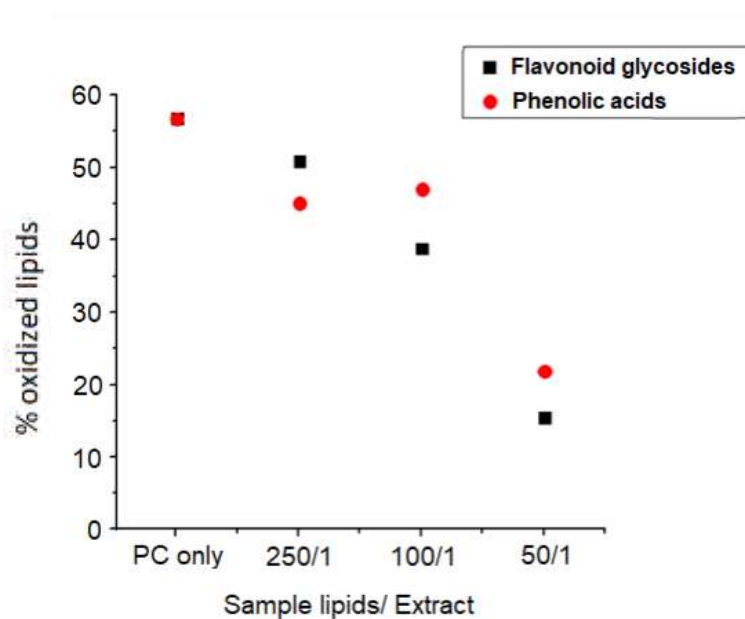
За да докажем, че флуоресценцията на паринарната киселина не е била повлияна пряко от полифенолите ние проведохме контролни измервания без реакционна смес. В присъствието само на растителните екстракти не открихме разлика във флуоресцентния сигнал (фиг. 31).



Фиг. 30. Изследване на антиоксидантните свойства на флавоноидните гликозиди (FG) а) и фенолните киселини (Ph. acids) б) в липозоми от фосфатидилхолин (PC) чрез метода на гасенето на паринарната киселина (PA) от окисляваща реакционна смес (RM).



Фиг. 31. Полифенолите не повлияват флуоресценцията на паринарната киселина.



Фиг. 32. Антиоксидантно действие на флавоноидните гликозиди и фенолните киселини, установено чрез метода на гасенето на паринарната киселина.

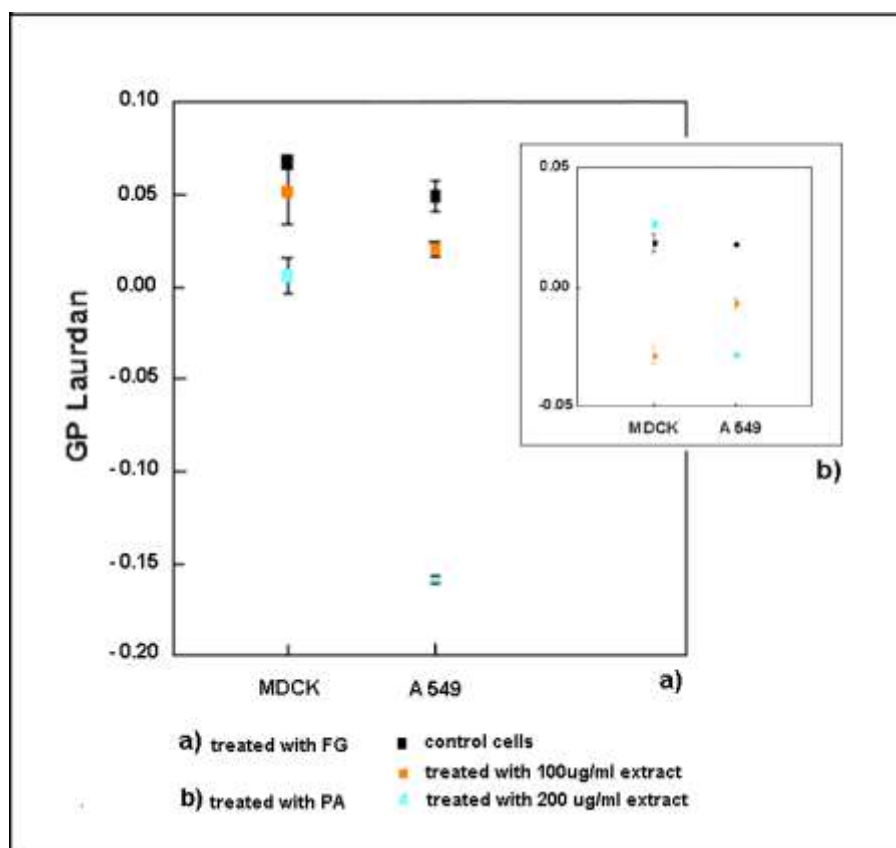
### **2.2.3. Спектрофотометрично изследване на ефекта на полифенолите върху подредеността на липидите на клетъчни мембрани.**

Следващият етап от нашата работа беше да изследваме ефекта на екстрактите върху многокомпонентната и сложно функционираща система на клетъчните мембрани. Приложихме метода на Лаурдан флуоресцентната спектроскопия спрямо контролни клетки и клетки, третирани с екстрактите. За експериментите използвахме нефиксирани клетки от клетъчните линии A549 и MDCK. Нераковите клетки от бъбречен епител според тяхната функция в организма са способни да поляризират. Наличието на множество специфични междуклетъчни контакти (които са асоциирани с рафтовете), осигуряват поляризацията и поради тази причина се очаква MDCK да имат по- подредени мембрани в сравнение с раковите клетки A549 (пневмоцити тип 2). Контролните клетки показаха резултати, които потвърдиха тези наши очаквания.

Открихме флуидизиране на мембраните и на двете клетъчни линии след третиране с флавоноидни гликозиди. Стойностите на общата поляризация бяха пониски в пробите с третирани клетки. Най-значителен ефект наблюдавахме след третиране на ракови клетки с концентрация от 200  $\mu\text{g/ml}$ .

Фенолните киселини флуидизираха мембраните на раковите клетки концентрационно- зависимо. Мембраните на MDCK клетките станаха по-флуидни след третиране с концентрация от 100  $\mu\text{g/ml}$ , докато при 200  $\mu\text{g/ml}$  се наблюдаваше леко намаляване на флуидитета спрямо контролата (фиг. 33).

Беше отчетена значителна разлика в действието на флавоноидните гликозиди върху раковите и нераковите клетки. Изразеното флуидизиране на мембраните на клетки A549 може да бъде разглеждано като възможен механизъм, който нарушава целостта на клетката и може да доведе до нарушения в развитието на тези ракови клетки.



Фиг. 33. Лаурдан флуоресцентната спектроскопия на клетки MDCK и A 549.

Молекулните сонди Laurdan и di-4-ANEPPDHQ се свързват на различна дълбочина в липидния бислой [41]. Според експерименталните данни двете сонди дават различен отговор при промяна на полярността на разтворителя, което предполага и разлика в механизма на отместването на спектъра. Показано е, че Laurdan е чувствителен към промяната на температурата, докато флуоресценцията на di-4-ANEPPDHQ е много чувствителна към съдържанието на холестерол в липозоми с точно определен състав. Също така при di-4-ANEPPDHQ диполната релаксация не е проста, както е случаят с Laurdan. Причината, поради която получихме различни резултати при изследването с двете сонди може да се дължи на това, че те взаимодействат по различен начин с биомембраните и следователно емисионният им спектър се повлиява от различни свойства на мембраната. При изследването на биологични системи (клетки) промяна в хидратацията, съдържанието на холестерол и мембранный потенциал влияят върху флуоресценцията и на двете проби, но по различен начин. Di-4-ANEPPDHQ първоначално е създадена като потенциометрична сонда (чувствителна към промяна в напрежението/ електрохромна), и поради тази причина di-4-ANEPPDHQ проявява чувствителност към промяната на

трансмембрания потенциал. Di-4-ANEPPDHQ също проявява силна чувствителност и към съдържанието на холестерол в липидния бислой. Съвсем нови експерименти показват влиянието на концентрацията на двете багрила върху GP-стойностите. При повишаване на концентрациите на Лаурдан е наблюдавано малко, но значимо намаляване на GP-стойностите при липозоми, но не и при клетъчни мембрани. Регистриран е обратния ефект при приложение на di-4-ANEPPDHQ, където няма значителна промяна в GP при липозоми, но при биологични мембрани е отчетено съществено и значимо намаляване на GP-стойностите.

### Изводи

- Хлороформният *in vitro* екстракт от *Lamium album* проявява най-висока селективност към раковите клетки, като след аклиматизацията на растенията обратно в естествената им среда, не се наблюдава значителна разлика в ефекта на екстракта върху ракови и неракови клетки.
- Потенциалното приложение на екстрактите от *Lamium album* в състава на медикамент за вътрешна употреба не би било безопасно, поради откритото наличие на известна генотоксичност на екстрактите върху нераковите клетки.
- Сред екстрактите от растения от род Инула най-добра селективност към раковите клетки проявиха хлороформните екстракти от *Inula oculus-christi*, *Inula aschersoniana* и екстрактът от листа на *Inula germanica*.
- От тестваните фракционирани екстракти от *Inula oculus-christi*, най-добра селективност проявиха флавоноидните гликозиди и фенолните киселини. Тези две фракции имат противоположен ефект по отношение на въздействие върху структурната организация на мембраните на раковите клетки, като и двете фракции предизвикват съществени промени в организацията на актиновия им цитоскелет.
- Флавоноидните гликозиди и фенолните киселини предизвикват умерени промени в актиновия цитоскелет на нераковите клетки. Различното влияние на флавоноидните гликозиди към раковата и нераковата клетъчна линия дава основание за по-нататъшни изследвания с цел изясняване на механизма на тяхното действие.
- Двата полифенолни екстракта проявяват подреждащ ефект върху моделни мембранни системи, изградени от фосфатидилхолин, докато върху мембраните от сфингомиелин екстрактите имат разнопосочно действие –

флавоноидните гликозиди подреждат липидите в бислоя, докато фенолните киселини ги флуидизират.

- Двата полифенолни екстракта флуидизират мембраните в липозоми, представящи състава на рафтовете в клетъчните мембрани, но общият обем на самата рафт-подобна фракция обаче се увеличава под тяхно въздействие при трикомпонентните смеси. Достигането на максимум в рафт-образувания ефект при везикулите с високо съдържание на холестерол предполага евентуална конкуренция с холестерола за взаимодействие с липидите и подобен на холестерола ефект върху мембраните.

- Беше потвърдена очакваната антиоксидантна активност на полифенолите, а екстрактът, съдържащ флавоноидни гликозиди е определен като по-добър антиоксидант от двата.

#### **Приноси:**

- За първи път беше сравнена биологичната активност и селективното действие към туморни клетки на екстракти от *Lamium album* L., като беше установена по-голяма ефикасност на екстракта от *in vitro* култивирани растения в сравнение с адаптираните към естествени условия на отглеждане и растенията от природни находища.
- Беше изследвана за първи път цитотоксичността и селективното действие към туморни клетки на екстракти от седем различни български видове от род Инула и растенията бяха групирани според степента на действието им. Най-добър ефект показаха екстрактите от *Inula oculus-christi*.
- Проведени са пилотни изследвания върху влиянието на флавоноидни гликозиди и фенолни киселини, изолирани от *Inula oculus-christi* върху структурната организация на липидния бислой в клетъчни мембрани и моделни мембранни системи.

#### **Публикации, свързани с темата на дисертацията:**

1. Veleva R., Moskova-Doumanova V., Doumanov J., KapchinaToteva V., Topouzova-Hristova T., *Comparative analysis of biological activity of extracts from cultivated and wild plants Lamium album L.* Sci Technol., 2014, 4(1):122-6.

- забелязани 5 цитата.

2. Veleva R., Petkova B., Moskova-Doumanova V., Doumanov J., Dimitrova M., Koleva P., Mladenova K., Petrova S., Yordanova Z., Kapchina-Toteva V., Topouzova-Hristova T., *Changes in the functional characteristics of tumor and normal cells after treatment with extracts of white dead-nettle*. Biotechnol Equip., 2015. Jan 2;29(1):181-188.  
- забелязани 7 цитата.
3. Veleva R., Moskova-Doumanova V., Todorova M., Trendafilova A., Doumanov J., Topouzova-Hristova T., *Cytotoxicity of flavonoid glycosides, flavonoids and phenolic acids from Inula oculus-christi on mammalian cell lines*. Journal of BioScience and Biotechnology, 2016. 5(3):2019-224.  
- забелязан 1 цитат.
4. Veleva R., Moskova-Doumanova V., Dragolova D., Doumanov J., Topouzova-Hristova T., *Comparative analysis of cytotoxicity of chloroform extracts from Lamium album L. and morphological alterations in mammalian cells*. Ann. Univ. Sofia., 2017. Volume 102, pp. 194 – 204.
5. Veleva R., Borisova M., Milev M., Kostadinova A., Mravkov B., Doumanov J., Moskova-Doumanova V., Trendafilova A., Todorova M., Topouzova-Hristova T., *Comparative analysis of effects of sesquiterpene lactones and polyphenols from Inula oculus-christi L. on normal and cancer cells*. Ann. Univ. Sofia., 2018. Volume 103, pp. 13-21.
6. Veleva R., Staneva G., Topouzova-Hristova T., *Comparative analysis of membrane lipid order imaging with two fluorescent probes in intact cells*. Ann. Univ. Sofia., 2019. Volume 104, pp. 42-51.
7. Trendafilova A., Ivanova V., Rangelov M., Todorova M., Ozek G., Yur S., Ozek T., Aneva I., Veleva R., Moskova-Doumanova V., Doumanov J., Topouzova-Hristova T., *Caffeoylquinic Acids, Cytotoxic, Antioxidant, Acetylcholinesterase and Tyrosinase Enzyme Inhibitory Activities of Six Inula Species from Bulgaria*. Chem Biodivers., 2020. Apr;17(4):e2000051.  
- забелязани 11 цитата.

#### **Участия в научни форуми:**

1. Младежка научна конференция “Климентови дни” 17-18 ноември, 2016 г. , София , Биологически факултет. Постер на тема „Comparative analysis of cytotoxicity of chloroform extracts from Lamium album L. and morphological alterations in mammalian cells“ с автори: Ralitsa Veleva, Veselina Moskova-Doumanova, Daniela Dragolova, Jordan Doumanov, Tanya Topouzova-Hristova
2. XXVII международна научна конференция на Съюза на учените - Стара Загора, 1-2. 06. 2017. Постер на тема „Screening for anticancer activity of chloroform extracts from several Inula species“, с автори: Ralitsa Veleva, Tanya Topouzova-Hristova, Victoria Ivanova, Veselina Moskova-Doumanova.
3. Научна сесия „Биомедицина и качество на живот – младите в науката“, 26-27. 06. 2017г. организирана от Института по биофизика и биомедицинско инженерство – БАН със съдействието на Съюза на учените в България. Доклад на тема „Flavonoid glycosides extracted from Inula are raft making molecules“, с автори: Ralitsa Veleva, Tanya Topouzova-Hristova, Aneliya Kostadinova, Veselina Moskova-Doumanova, Albena Momchilova, Galya Staneva.
4. Международната научна конференция ICNPU 2017. 18-21. 10. 2017, Банско. Постер на тема „Flavonoid glycosides extracted from Inula reorganize raft-like membrane domains“, автори: R. Veleva, T. Topouzova-Hristova, A. Kostadinova, V. Moskova-Doumanova, A. Momchilova, G. Staneva.

5. Младежка научна конференция с международно участие „Климентови дни“ – 16-17. 11. 2017г. Постер на тема „The effect of polyphenols on actin cytoskeleton of epithelial cells“, с автори: R. Veleva, T. Topouzova-Hristova, A. Kostadinova, A. Trendafilova, J. Doumanov, V. Moskova-Doumanova..
6. Младежка научна конференция с международно участие „Климентови дни“ – 16-17. 11. 2017г. Постер на тема “Comparative analysis of effects of lactones and polyphenols from *Inula oculus-christi* on normal and cancer cells” R. Veleva, M. Borisova, M. Milev, A. Kostadinova, B. Mravkov, A. Trendafilova, M. Todorova, J. Doumanov, V. Moskova-Doumanova, T. Topouzova-Hristova.
7. XXVIII международна научна конференция на Съюза на учените - Стара Загора 31.05-01.06 2018. Доклад на тема „APPLICATION OF FLUORESCENCE METHODS FOR ANALYSIS OF LIPID DOMAINS IN BIO-MEDICAL INVESTIGATIONS”.Ralitsa Veleva, Galya Staneva, Aneliya Kostadinova, Rusina Hazarsova, Veselina Moskova-Doumanova, Tanya Topouzova-Hristova
8. Национална конференция с международно участие „Морфологични дни“ – 8-10.06. 2018г. Кратко устно съобщение на тема „Effects of extracts from species of genus *Inula* on epithelial cells' morphology“. Ralitsa Veleva, Veselina Moskova-Doumanova, Jordan Doumanov, Kirilka Mladenova, Aneliya Kostadinova, Antoaneta Trendafilova, Tanya Topouzova-Hristova
9. 10th JUBILEE CONFERENCE OF THE BALKAN PHYSICAL UNION SOFIA, BULGARIA, 26 – 30 AUGUST 2018. Постер на тема “Effect of Polyphenolic Compounds Extracted from *Inula Oculus-christi* on Lipid Oxidation and Packing in Artificial Membranes” с автори: Ralitsa Veleva, Tanya Topouzova-Hristova, Veselina Moskova-Doumanova, Jordan Doumanov, Aneliya Kostadinova, Antoaneta Trendafilova, Galya Staneva
10. Младежка научна конференция „Климентови дни” 8-9. 11. 2018. Доклад на тема “COMPARATIVE ANALYSIS OF MEMBRANE LIPID ORDER IMAGING WITH TWO FLUORESCENT PROBES IN INTACT CELLS”. Ralitsa Veleva, Veselina Moskova-Doumanova, Jordan Doumanov, Kirilka Mladenova, Aneliya Kostadinova, Galya Staneva, Tanya Topouzova-Hristova
11. XXIX Международна научна конференция на Съюза на учените - Стара Загора 6-7. 06. 2019. Доклад на тема “БИОЛОГИЧНА АКТИВНОСТ НА ЕКСТРАКТИ ОТ *INULA HELENIUM*, *INULA SALICINA*, *INULA SPIRAEIFOLIA* (ASTERACEAE)” автори: А. Костадинова, В. Иванова, Р. Велева, А. Трендафилова, В. Московска-Думанова, Д. Мелнишка, К. Младенова, Й. Думанов, Т. Топузова-Христова
12. XXIX Международна научна конференция на Съюза на учените - Стара Загора 6-7. 06. 2019. Доклад на тема “СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА БИОЛОГИЧНАТА АКТИВНОСТ НА МЕТАНОЛОВИ ЕКСТРАКТИ ОТ РАСТЕНИЯ ОТ РОД *INULA*” с автори: Р. Велева, В. Иванова, А. Трендафилова, В. Московска-Думанова, К. Младенова, А. Костадинова, Й. Думанов, Т. Топузова-Христова
13. Втора научна сесия “Биомедицина и качество на живот”, ИБФБМИ-БАН, 4-5. 11. 2019г. Доклад на тема: “Antioxidative and packing properties of plant polyphenolic compounds on artificial and cell plasma membranes studied by fluorescence methods” с автори: Ralitsa Veleva, Aneliya Kostadinova, Tanya Topouzova-Hristova, Antoaneta Trendafilova, Galya Staneva
14. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOINFORMATICS AND BIOMEDICINE BioInfoMed'2020, 8-10. 10. 2020, Бургас, постер на тема “Polyphenols Extracted from the Plant *Inula Oculus-Christi* Induced Membrane and Cytoskeleton Reorganisation in Cancer and Non-cancer Cells” с автори Ralitsa Veleva, Tanya Topouzova-Hristova, Antoaneta



Trendafilova, Anelia Kostadinova, Veselina Moskova-Doumanova, Kirilka Mladenova, Jordan Doumanov, Galya Staneva

### **Използвана литература:**

1. Eid et al., 2015; Evid Based Complement Alternat Med., 2015. 868424. doi: 10.1155/2015/868424.
2. Станева, Панова, и сътр., 1986; Медицина и Физкултура.
3. Dukes et al., 2011; Mol Biol Cell., Sep;22(17):3192-205.
4. Kapchina-Toteva et al., 2014; J. Plant Physiol., 171 (15), 1344–1353.
5. Valyova et al., 2011; J. Pharmacy Research, 4 (4):945–947.
6. Peng et al., 2013; Biomed Res Int., 2013:579859.
7. Senawong et al., 2013; BMC Complement Altern Med., 13:232.
8. Eroğlu et al., 2015; Tumour Biol., 36(12):9437-46.
9. Fong et al., 2016; Chin Med., 11: 45.
10. Ding et al., 2009; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 19; 3607–3610.
11. Hema et al., 2011; Cancer Biology, 1 (1), 13-17.
12. Hollander-Czytko et al., 2005; J. Plant Physiol., 162, 767-770.
13. Castro-Gomes T., et al., 2016; PLoS One, 11(3): e0152583.
14. Andrews et al., 2014; Trends Cell Biol., 24(12):734-42.
15. Wang et al., 2017; Food Funct., Aug 1;8(8):2924-2934.
16. Dorn et al., 2006; Phytother Res., Nov;20(11):970-80.
17. Rasul et al., 2013; ScientificWorldJournal, Oct 27;2013:248532.
18. Singhal et al., 1995; Biochem. Biophys. Res. Commun., Mar 8;208(1):425-31.
19. Middleton et al., 2000; Pharmacol Rev., Dec;52(4):673-751. PMID: 11121513.
20. Kim et al., 2003; J Cell Biochem., Jun 1;89(3):529-38.
21. Ren et al., 2003; Medicinal Research Reviews, 23: 519-534.
22. Cushnie and Lamb, 2005; International journal of antimicrobial agents, 26: 343-356.
23. Kandaswami et al., 2005; In Vivo. Sep-Oct;19(5):895-909.
24. Ferrazzano et al., 2011; Molecules, Feb 11;16(2):1486-507.
25. Nakamura et al., 2000; Carcinogenesis, Oct;21(10):1899-907.
26. Halliwell B., 2008; Arch Biochem Biophys., Aug 15;476(2):107-12.
27. Yang et al., 2014; Toxicol In Vitro, Apr;28(3):388-96.
28. Moghadam et al., 2012; Nat Prod Commun., Aug;7(8):979-80.
29. Wang et al. 2014; Expert Opin Investig Drugs, Mar;23(3):317-45.
30. Zhao et al. 2006; Chem Biodivers., Apr;3(4):371-84.
31. Moghadam et al., 2013; Z Naturforsch C J Biosci., 2013. Mar-Apr;68(3-4):108-12.
32. Kampa et al. 2004; Breast Cancer Res., 6(2):R63-74.
33. Martins, et al. 2015; Chem Biol Interact., Feb 25;228:46-56.
34. Owen et al., 2011; Nat Protoc., 2011. Dec 8;7(1):24-35.
35. Wheeler et al., 2011; Biochim Biophys Acta. Mar;1808(3):634-41.
36. Çetinel and Bilge, 2022; Journal of Molecular Liquids, Volume 356, 15 June, 119041.
37. Tsuchiya et al., 2002; Biofactors. 16(3-4):45-56.
38. Sakihama, Cohen et al. 2002; Toxicology., 2002. Aug 1;177(1):67-80.
39. Arora et al., 2000; Arch Biochem Biophys., 373: p.102-09.
40. Takahama and Oniki, 1997; Plant and Cell Physiology, Volume 38, Issue 4, 1997, Pages 456–462.
41. Dinic et. al., 2011; Biochim Biophys Acta., Jan;1808(1):298-306.

