



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ "СТЕФАН АНГЕЛОВ"

АС. ЛЮДМИЛА ЛЮДМИЛОВА ДИМИТРОВА

Биологична активност на екстракти и съединения, изолирани от
***Geum urbanum* L.**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна
степен „Доктор“

Професионално направление: **4.3 „Биологически науки“**,

Научна специалност: **01.06.12 „Микробиология“**

Научни ръководители: **чл. кор. проф. Христо Найденов, дмн**

чл. кор. проф. Вася Банкова, дхн

София, 2019



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ "СТЕФАН АНГЕЛОВ"

АС. ЛЮДМИЛА ЛЮДМИЛОВА ДИМИТРОВА

Биологична активност на екстракти и съединения, изолирани от
***Geum urbanum* L.**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна
степен „Доктор“

Професионално направление: **4.3 „Биологически науки“**,

Научна специалност: **01.06.12 „Микробиология“**

Научни ръководители: **чл. кор. проф. Христо Найденски, д-мн**

чл. кор. проф. Вася Банкова, д-хн

Научно жури: **чл. кор. проф. Христо Найденски, д-мн**

проф. Мария Ангелова, д-бн

проф. Спиро Константинов, д-м

доц. д-р Веселин Късовски

доц. д-р Антоанета Трендафилова

София, 2019

Настоящият дисертационен труд е разработен в Лаборатория по зоонози и бактериална вирулентност при ИМикБ-БАН и Лаборатория „Химия на природните вещества“ при ИОХЦФ-БАН. Антиоксидантната активност е изследвана в секция Микология, противовирусната активност – в Лабораторията по експериментална химиотерапия на ентеровирусните инфекции и Лабораторията по ДНК вируси и онколитични вируси към ИМикБ. Трансмисионната електронна микроскопия беше извършена в ИЕМПАМ-БАН, докато сканиращата електронна микроскопия-във Физическия Факултет на СУ „Св. Климент Охридски“. Експериментите от антилимфомната активност са проведени в Националния институт за радиологични изследвания, Япония.

Дисертационният труд обхваща 180 страници, съдържа 38 фигури и 20 таблици. Библиографската справка включва 343 литературни източника, от които 180 са публикувани в периода 2009-2019 г.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширено заседание на Националния семинар по патогенни микроорганизми и инфекциозна имунология на 25.03.2019 г. в Института по микробиология – БАН.

Изпитът по публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на от часа в залата на Института по микробиология “Стефан Ангелов” – БАН, ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 26, София.

Номерацията на фигурите в автореферата не съответства на тази в пълния текст на дисертацията.

Материалите по защитата са на разположение в кабинета на научния секретар на Институт по микробиология „Стефан Ангелов”, ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 26, София.

БЛАГОДАРНОСТИ И ФИНАНСИРАНЕ НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Бих искала да изкажа своите най-искрени благодарности към научните си ръководители чл. кор. проф. Христо Найденски, дмн и чл. кор. проф. Вася Банкова, дхн, преди всичко за предоставения шанс за научно развитие, всестранна помощ, създадените условия за реализиране на изследванията ми и оказаното ми доверие!

Благодаря още на:

Доц. Милена Попова (*ИОХЦФ – БАН*)

Доц. Милка Милева, доц. Стоянка Стоицова, гл. ас. Мая Захариева, гл. ас. Иванка Николова, гл. ас. Нели Вилхелмова и гл. ас. Неделина Костадинова (*ИМикБ – БАН*)

Проф. Спиро М. Константинов (*Фармацевтичен Факултет, Медицински Университет – София*)

Проф. Марин Александров, доц. Руси Русев, гл. ас. Катерина Ганчева и специалист Йосиф Велков (*ИЕМПАМ – БАН*)

Физик Галя Русева (*Физически Факултет, СУ „Св. Климент Охридски“*)

Благодаря на баща ми, приятеля ми и на всички колеги от Департамента по Инфекциозна Микробиология, както и от Лаборатория „Химия на природните вещества“, за обичта, търпението, разбирането, подкрепата и вярата, които ми даваха през годините!

Част от получените резултати бяха финансирани от БАН по Програма за Подпомагане на Младите Учени в БАН – 2016 на проект ДФНП-70/27.04.2016 на тема: „Проучване на екстракти и биологично активни вещества от *Geum urbanum* L. като лекарствени кандидати с антимикробна и антинеопластична активност“!

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица:

ААФ – активните азотни форми; АИ – автоиндуктори; АКФ – активни кислородни форми; АМР – антимикробна резистентност; Грам(-) – Грам-отрицателна бактерия; Грам(+) – Грам-положителна бактерия; ДНК – дезоксирибонуклеиновата киселина; КОЕ – колонии образуващи единици; МБК – минимална инхибираща концентрация; МИК – минимална инхибираща концентрация; НСТ – нитро син тетразолиев хлорид; ТАК – тотален антиоксидантен капацитет; ЯМР – ядрено-магнитен резонанс

На латиница (превод от английски език):

АТСС – Американска колекция за клетъчни култури, САЩ; CC_{50} – 50% цитотоксична концентрация; 95% CI – 95% интервал на достоверност; CLSI – Институт по клинични и лабораторни стандарти; CVB1 – коксаки вирус В1; DCF – 2',7'-дихлородихидрофлуоресцин; ДЕНА – дехидрогеназна активност; dH_2O – дестилирана вода; ДНЕ – дихидроетидиум; DPPH – 2, 2-дифенил-1-пирилхидразил; EBV – Вирус на Епщайн-Бар; EC_{50} – половината от максималната ефективна концентрация; EtOAc – етил ацетат; EtOH – етанол; EUCAST – Европейски комитет за тестване на чувствителност към антимикробни средства; GSH – глутатион; H_2O_2 – водороден пероксид; HAdV5 – човешки аденовирус тип 5; HSQC – 2D хетеронуклеарна единична квантова кохерентност; HSV-1 – херпесен вирус тип 1; IC_{50} – 50% от максималната инхибиторна концентрация; MeOH – метанол; MRSA – резистентен щам от вид *S. aureus* към метицилин; MTT – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид; NBIMCC – Национална банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури, България; *n*-BuOH – бутанол; NCTC – Национална колекция от видове култури, Англия; NO – азотен оксид; $ONOO^-$ – пероксинитритен анион; $O_2^{\cdot-}$ – супероксиден анионен радикал; PSer – фосфатидилсерин) RAP – РНКIII активиращ протеин; $ROO^{\cdot}$ – пероксиден радикал; SAIMC – Колекция на Института по микробиология "Стефан Ангелов", България; SD – стандартно отклонение; SI – индекс на селективост; TRAP – мишена на РНКIII активиращ протеин.

ВЪВЕДЕНИЕ



Род *Geum* (сем. *Rosaceae*) се състои от около 70 растителни вида, обитаващи умерените климатични зони, много от които са богати на биологично активни съединения и следователно могат да бъдат източници на нови растителни продукти с фармакологичен потенциал. Осем от тях са част от българската флора, сред които е и лечебното растение *Geum urbanum* L. То е широко разпространено на територията на страната и се използва от древни времена в народната медицина за лечение на стомашно-чревни заболявания, нарушения на черния дроб, жлъчните пътища и матката, както и срещу хемороиди.

Според Световната Здравна Организация ежегодно нараства процента на антимикробна резистентност към клинично прилаганите антибиотици. В повечето случаи хроничните бактериални и вирусни инфекции рецивидират във възпалителни процеси и онкологични заболявания, които често завършват с летален изход. През последните 10 г. се наблюдава висока противотуморна успеваемост на фитохимиотерапията. В основата ѝ лежи прилагането на фитокомплекси с антинеопластичен ефект. Предимство на този подход е минимализиране на страничните ефекти от лечението. Повече от 200 съединения (тритерпеноиди, флавоноиди, хидролизируеми танини, фенилпропаноиди и др.) са изолирани от род *Geum* след 1920 г., но химичния състав на *G. urbanum* L. по отношение на вторичните му метаболити, тяхната биологична активност и възможностите им за приложение в медицинската практика са проучени оскъдно.

Разширяването на познанията за химичния състав, антиоксидантната, антимикробната и антинеопластичната активности биха допринесли за пълноценното и рационално използване на широко разпространения вид *G. urbanum* L. в България като източник на лечебни екстракти и биологично активни вещества.

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

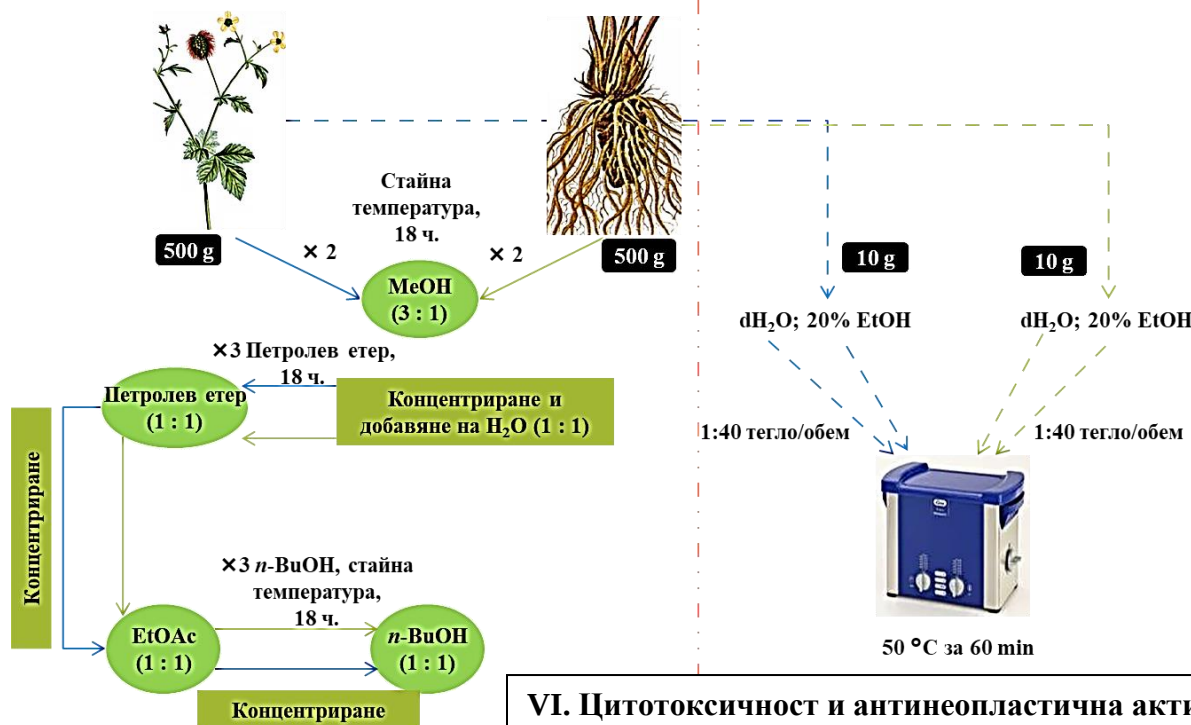
Цел: изследване на химичният състав и биологичните ефекти на екстракти, получени от лечебното растение *G. urbanum*.

Задачи:

1. Получаване на екстракти от *G. urbanum* и фитохимичното им охарактеризиране;
2. Проучване на антиоксидантна активност на екстракти от изследваното растение;
3. Изолиране и идентифициране на индивидуални съединения от *G. urbanum*;
4. Определяне на антимикробна активност на екстракти и съединения, изолирани от *G. urbanum*;
5. Изследване на потенциала на екстракти от растението срещу бактериални фенотипове – кворум сенсинг;
6. *In vitro* определяне на цитотоксичния и антинеопластичен потенциал на екстракти и съединения, изолирани от *G. urbanum*.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

I. Схема на екстракция:



II. Съдържание на фенолни съединения:

Качествени химични реакции и метод на Folin-Ciocalteu.

III. Антиоксидантна активност:

Методи на 2,2-дифенил-1-пирилхидразила (DPPH·) и супероксидния анионен радикал (O₂^{·-}).

IV. Изолитране на индивидуални химични съединения:

Течна вакуумна хроматография, колонна хроматография върху Sephadex LH-20, силикагел и полиамид, както и препаративна тънкослойна хроматография.

V. Антимикробна активност:

Минимална инхибираща и бактерицидна концентрация (МИК/МБК), дехидрогеназна (DEHA) активност, бактерицидна активност в динамика, сканираща електронна микроскопия, инхибиторен ефект върху бактериални фенотипове и противовирусен ефект.

VI. Цитотоксичност и антинеопластична активност:

1. Клетъчни линии: НЕК-293 (човешки ембрионални бъбречни клетки), ССL-1 (миши фибробласти), НЕР-G2 (човешки хепатоцелуларен карцином), Т-24 (човешки карцином на пикочния мехур, стадий III) и ВС-3С (човешки карцином на пикочния мехур, стадий IV)

Тест с 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ); клетъчна клоногенна способност; нива на каспаза-3, глутатион (GSH) и фрагментирана ДНК в клетъчния цитозол; трансмисионна електронна и флуоресцентна микроскопии.

2. Клетъчна линия: Raji (лимфом на Бъркит)

Тест с трипаново синьо; нива на апоптоза, тотален антиоксидантен капацитет (ТАК), активни кислородни и азотни форми (АКФ/ААФ) и O₂^{·-}.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Получаване на растителни екстракти

Корените и надземните части от *G. urbanum* са отделни търговски продукти, произведени от Съни-Ямбол ЕООД (2014 г.). Бяха използвани два метода на екстракция: мацерация и кавитация. Първият е конвенционален, по-бавен, нездравословен и по-скъп, тъй като използва големи количества органични разтворители (Paiva et al., 2010). Чрез този метод бяха получени общо 8 екстракта: тотални метанолни (MeOH) екстракти от корени и надземни части на изследвания растителен вид и техните фракции, получени чрез последваща екстракция с петролев етер (сухо вещество 1.9 g, респективно 7.9 g), етил ацетат (EtOAc) (сухо вещество 14.1 g, респективно 10.4 g) и бутанол (*n*-BuOH) (сухо вещество 14.8 g, респективно 17.82 g). Вторият метод беше осъществен в условията на ултразвук. Той е сравнително по-съвременен, по-бърз и по-надежден и има за цел да подобри селективността и добива на полифенолни съединения (Falleh et al., 2012). Чрез този подход бяха получени общо 4 екстракта: водни (dH₂O) (сухо вещество от корени 2.16 g и надземни части 1.35 g) и 20% етанолни (EtOH) (сухо вещество от корени 2.25 g и надземни части 0.94 g) на *G. urbanum*.

2. Общо съдържание на фенолни съединения в екстракти

Всички екстракти бяха тествани качествено и количествено за съдържанието на фенолни съединения и други вторични метаболити с антиоксидантен, антимикробен и антинеопластичен потенциал.

2.1. Качествено определяне

Съдържанието на танини, терпеноиди и флавоноиди беше определено визуално чрез качествени цветни реакции във всички дванадесет екстракта, получени от надземните части и корени на изследвания растителен вид *G. urbanum* (Таблица 1).

Таблица 1. Качествен химичен анализ на екстракти от *G. urbanum*

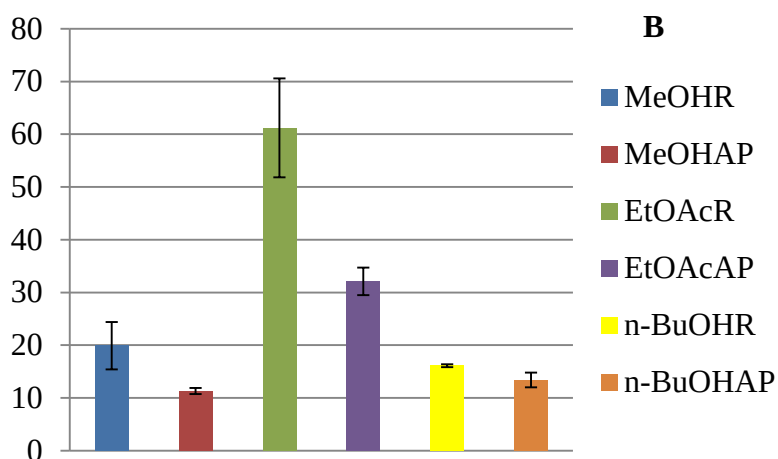
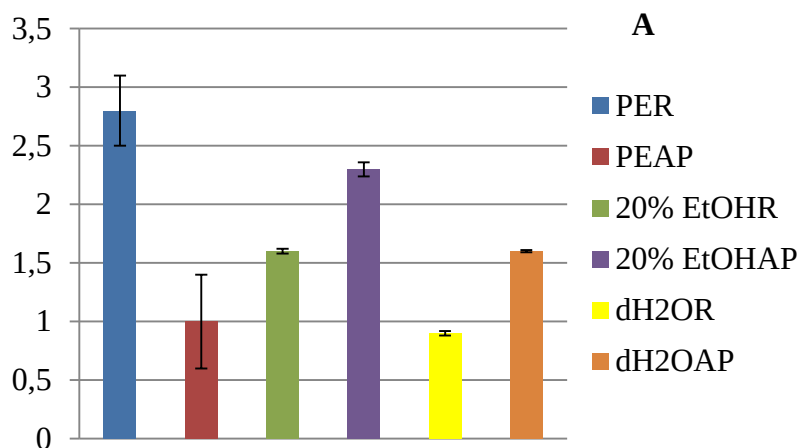
Фракции	Растителна част	Танини	Терпеноиди	Флавоноиди
MeOH	Надземна част	+	+	+
	Корени	+	++	++
Петрол етерни	Надземна част	-	-	+
	Корени	-	+	+
EtOAc	Надземна част	++	+	+
	Корени	++	++	++
<i>n</i> -BuOH	Надземна част	++	+	+
	Корени	++	+	+
20% EtOH	Надземна част	+	-	-
	Корени	+	-	+
dH ₂ O	Надземна част	+	-	-
	Корени	+	+	+

Легенда: (+) - слабо до средно оцветяване; (++) - силно оцветяване и (-) - отсъствие на оцветяване

От получените резултати се установи, че EtOAc и *n*-BuOH екстракти от надземни и подземни части са най-богати на танини. EtOAc и MeOH екстракти от корени са богати на терпеноиди и флавоноиди. С най-ниско съдържание на активни компоненти се характеризират надземните части на растението, фракционирани с петролев етер (танини и терпеноиди), 20% EtOH и dH₂O (терпеноиди и флавоноиди). В петрол етерния и 20% EtOH екстракти от корени не се открива наличието на танини, респективно на терпеноиди. Резултатите корелират с направената литературна справка, че по-полярните екстракти (в този случай MeOH, EtOAc и *n*-BuOH) са по-богати на различни групи вторични метаболити, в сравнение с останалите по-неполярни екстракти.

2.2. Количествено определяне

Концентрацията на общите полифенолни съединения беше определена за всичките 12 екстракта чрез колометричния метод на Folin – Ciocalteu (Фигура 1).



Фигура 1. Количествено определяне на общо фенолно съдържание (%) в екстракти

Легенда: PE в началото на означенията – петрол етерен екстракт, R в края на означенията – корени (превод от англ. roots), AP – в края на означенията – надземни части (превод от англ. aerial parts)

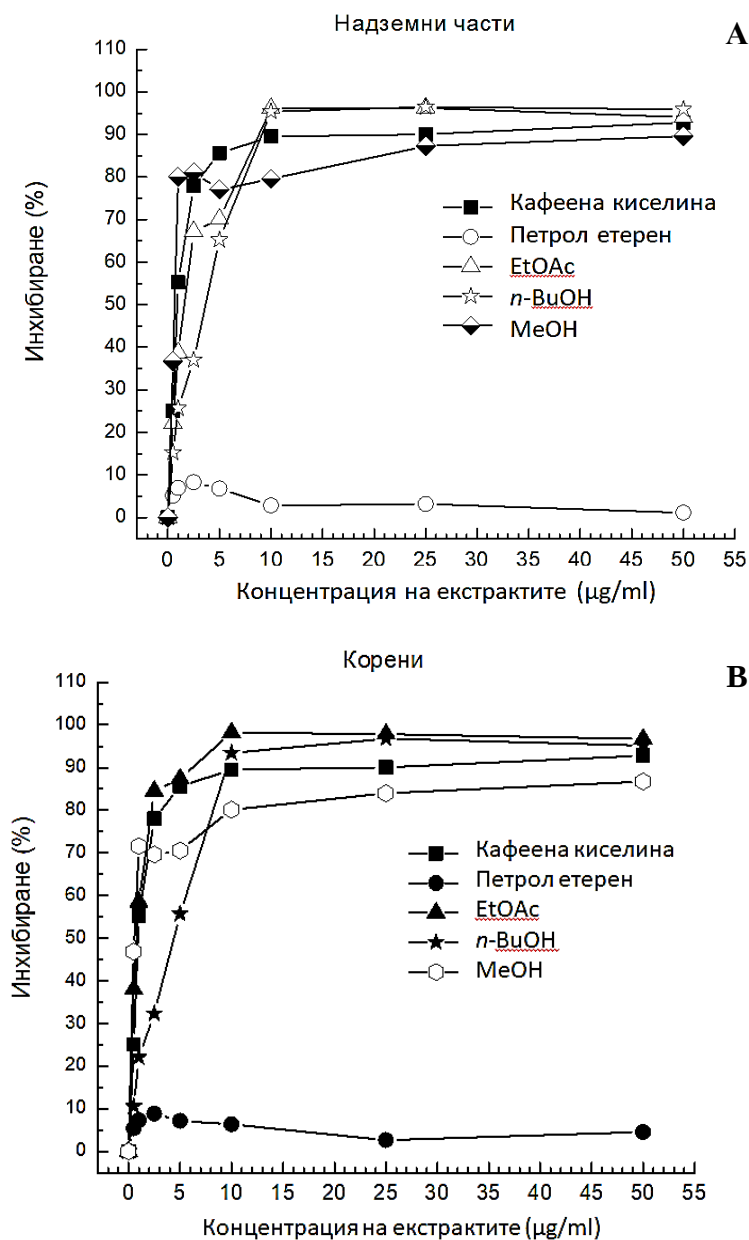
С най-високо съдържание на фенолни съединения се характеризират EtOAc екстракти от корени и надземни части ($61.2\% \pm 9.4$, респективно $32.1\% \pm 2.6$), последвани от MeOH ($19.9\% \pm 4.5$, респективно $11.3\% \pm 0.6$) и *n*-BuOH ($16.1\% \pm 0.3$, респективно $13.4\% \pm 1.4$) фракции (Фигура 1B). Петрол етерните, 20% EtOH и dH₂O екстракти съдържат много ниски количества полифенолни съединения, вариращи-от $0.9\% \pm 0.02$ до $2.8\% \pm 0.3$ (Фигура 1A). Очевидно, че в този случай EtOAc е най-подходящият разтворител за извличане на полифеноли, респективно антиоксиданти от тоталните MeOH екстракти на *G. urbanum*.

3. Определяне на радикал-улавяща и антиоксидантна активност

В допълнение към метода на Folin-Ciocalteu (Фигура 1), който се основава на окислително-редукционна реакция и дава оценка за наличието на фенолни съединения,

бяха проведени два анализа за определяне на радикал-улавящия потенциал на всички изследвани екстракти от *G. urbanum*.

3.1. Метод на DPPH•



Фигура 2. Радикал-улавяща активност на екстракти от надземни части (A) и корени (B) на *G. urbanum*

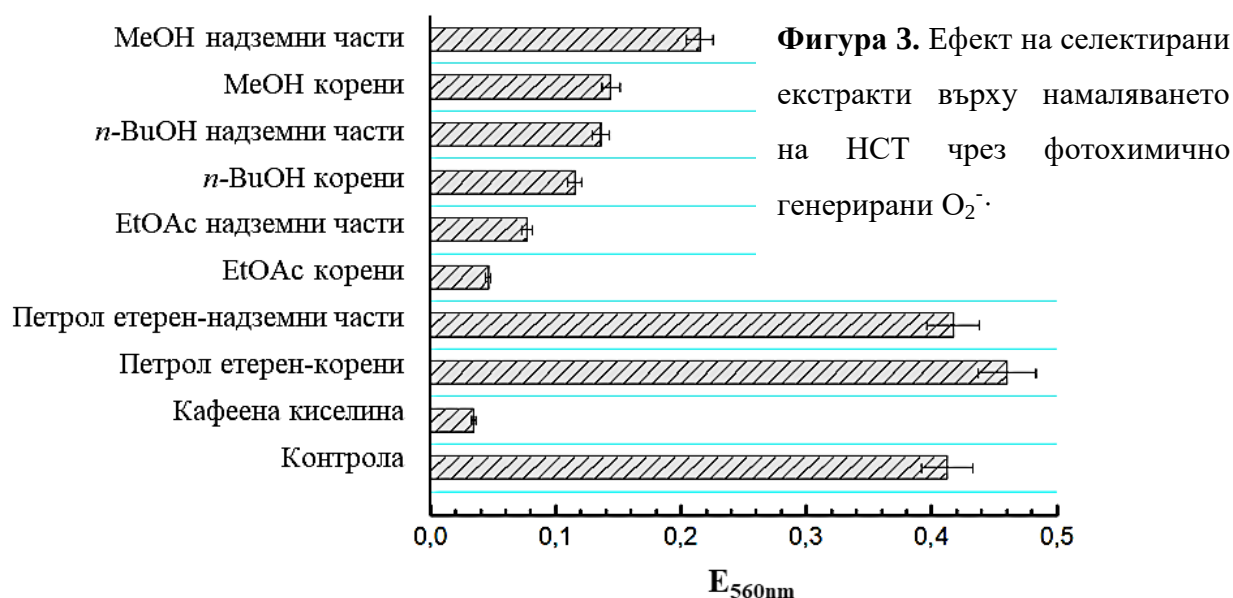
Метода на DPPH• е базиран на процеса на трансфер на електрони и се влияе от странични реакции като метално-йонна хелация и ензимно инхибиране, докато анализът на $O_2^{\cdot-}$ (Фигура 3 и Фигура 4) се основава на процеса на трансфер на водородни атоми (Badarinath et al., 2010). На Фигура 2A е представена ефективността на MeOH, петрол етерните, EtOAc и *n*-BuOH екстракти от надземни части и корени (Фигура 2B) на *G. urbanum* спрямо DPPH•.

От всички тествани екстракти, EtOAc екстракти от корени и надземни части демонстрираха най-висока антиоксидантна активност като стойностите им са близки до тези на положителната контрола-кафеена киселина (половината от максималната ефективна концентрация (EC_{50}) беше съответно 0.8 и 1.5 µg/ml), последвани от *n*-BuOH екстракти (с EC_{50} стойности за надземните части 4.5 µg/ml и корени 3.7 µg/ml) и тоталните MeOH екстракти. Инхибиторният ефект на петрол етерните фракции се

повишава само до 2.5 µg/ml. В сравнение, проучването на Owczarek и Gudej (2013) показва, че EtOAc фракции от диворастящ *G. urbanum*, събран от района на Лодз (Полша), имат стойности на EC₅₀ съответно 3.16 и 4.18 µg/ml. Важно е също да се отбележи, че методът на DPPH разпознава само ефектите от улавянето на свободните радикали, а не прооксидантната им активност. Някои добавки могат да функционират едновременно като анти- и прооксиданти, в зависимост от техния вид и концентрация (Amarowicz et al, 2004).

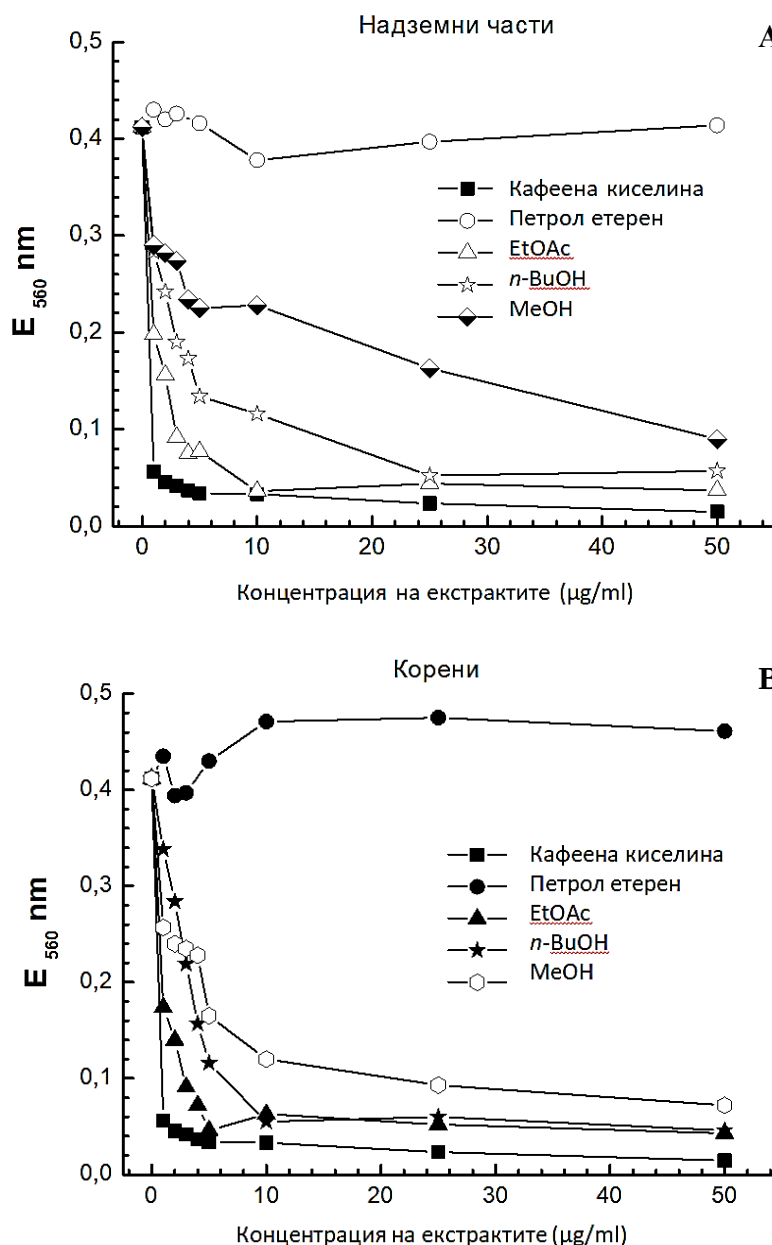
3.2. Метод на супероксидния анионен радикал

Допълнително изследване бе проведено за определяне на радикал-улавящата активност на екстрактите в не-ензимна система (нитро син тетразолиев хлорид (НСТ), метионин и рибофлавин), в която се генерират фотохимично O₂^{•-}. O₂^{•-} е един от най-силните агенти, увреждащи живите клетки, особено поради участието му в образуването на по-мощни и опасни хидроксилни радикали, както и на синглетен кислород, които допринасят за оксидативния стрес в човешкия организъм.



Повечето от изследваните екстракти намаляват интензитета на оцветяване на разтвора по време на реакцията между O₂^{•-} и НСТ. Най-висока радикал-улавяща активност демонстрираха EtOAc екстракти от корени и надземни части, последвани от n-BuOH и MeOH фракции.

Освен това, изследваните екстракти от надземни части (А) и корени (В) потискаха освобождаването на O₂^{•-} в зависимост от дозата начин (Фигура 4).



А **Фигура 4.** Степен на улавяне на $O_2^{\cdot-}$ от селектирани екстракти

Половината от максималната инхибиторна концентрация (IC_{50}) на EtOAc фракции от корени и надземни части са $0.9 \mu\text{g/ml}$, докато на положителната контрола (кафеена киселина) IC_{50} показва стойност $0.7 \mu\text{g/ml}$. От друга страна, двата петрол етерни екстракти, добавени в инкубационната смес, не показаха значителни промени в радикалулавящата активност на $O_2^{\cdot-}$. Получените резултати корелират добре с проведеният тест за общо фенолно съдър-

жание (Фигура 1). Последни проучвания показват, че именно полифенолните съединения от лечебните растения допринасят за улавянето на $O_2^{\cdot-}$ (Gangwar et al., 2014).

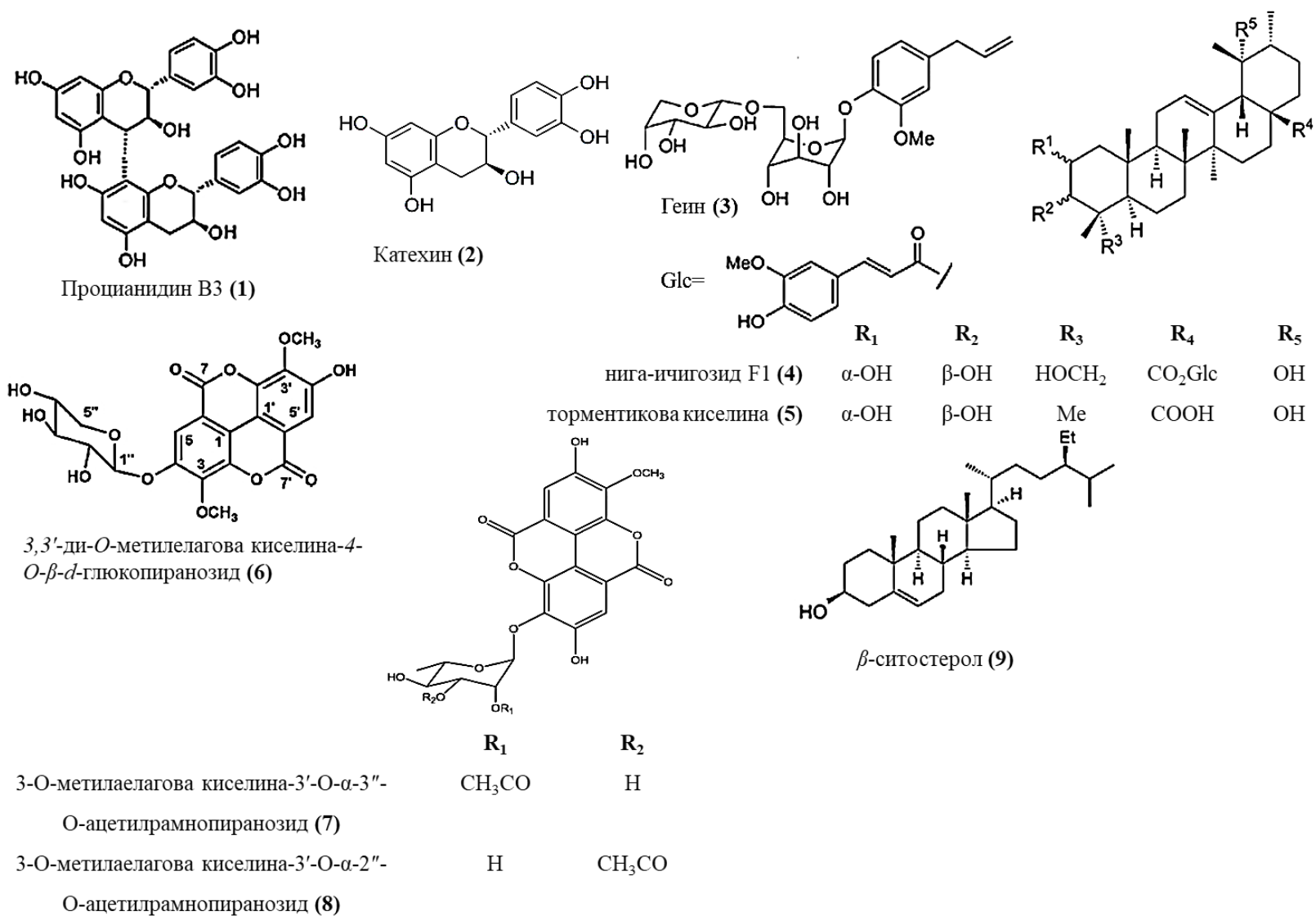
4. Изолране и идентифициране на индивидуални химични съединения

Предвид на обстоятелството, че EtOAc екстракт от корени на *G. urbanum* показва най-високо съдържание на полифенолни съединения и силна антиоксидантна активност спрямо $DPPH^{\cdot}$ и $O_2^{\cdot-}$, той беше подложен на подробен химичен анализ. От него бяха изолирани осем индивидуални съединения, чиито структури бяха определени чрез сравняване на получените спектрални характеристики от ядрено-магнитния резонанс (^1H и ^{13}C ЯМР) с литературните данни (Фигура 5). Доказани бяха процианидин В3 (**1**)

(Granica et al., 2016), катехин **(2)**, геин **(3)** и нига-ичигозид F1 **(4)** (Shahani et al., 2012), торментикова киселина **(5)** (Park et al., 2002), 3,3'-ди-*O*-метилелагова киселина-4-*O*- β -*D*-глюкопиранозид **(6)** (Pakulski and Budzianowski, 1996), 3-*O*-метилаелагова киселина-3'-*O*- α -3''-*O*-ацетилрамнопиранозид **(7)** и 3-*O*-метилаелагова киселина-3'-*O*- α -2''-*O*-ацетилрамнопиранозид **(8)** (Kim et al., 2001). В допълнение беше разработен и петрол етерния екстракт на корени, от който беше изолиран β -ситостерол **(9)**. Спектрите от ^1H , ^{13}C , HSQC и HMBC ЯМР на всички изолирани съединения са представени в дисертационния труд.

При направената литературна справка на изолираните химични структури не се намериха данни досега съединения **(5)**, **(4)** и **(6)** да са откривани във вид *G. urbanum*, а компонентите **(7)** и **(8)** са нови за род *Geum*.

Фигура 5. Химична структура на изолираните съединения



5. Антимикробна активност на екстракти и съединения

5.1. Определяне на МИК и МБК

Определена е антимикробната активност на всички дванадесет екстракти (от надземни части и корени на *G. urbanum*) и изолираните съединения, с изключение на процианидин В (1), 3-О-метилаелагова киселина-3'-О- α -2''-О-ацетилрамнопиранозид (8) и β -ситостерол (9), тъй като те бяха изолирани в много малки количества, съгласно протоколите на Института по клинични и лабораторни стандарти (CLSI). Бяха спазени и препоръките на Европейския комитет за тестване на чувствителност към антимикробни средства (EUCAST), който е дефинирал параметри, определящи клиничните и епидемиологични гранични стойности на ефективните концентрации на антимикробните лекарства (EUCAST, 2018).

Изследваните екстракти в концентрации от 0.039 до 2.5 mg/ml показват различна антимикробна активност срещу следните бактериални щамове: *S. aureus* NBIMCC 3359, пеницилин – резистентен *S. aureus* ATCC 6538 P, метицилин – резистентен *S. aureus* NBIMCC 8327 (MRSA), *S. epidermidis* NBIMCC 1093 и *B. cereus* ATCC 9634. Не беше намерена активност срещу *L. monocytogenes* SAIMC C12, *S. pyogenes* SAIMC 10535, *B. subtilis* SAIMC 1A95, *E. coli* SAIMC WF+, *P. aeruginosa* NCTC 6749, *S. typhimurium* SAIMC 123 и *C. albicans* SAIMC 62I. Устойчивостта на Грам-(-) бактерии вероятно се дължи на наличието на външна мембрана и/или на плазмидни гени, които действат като бариера за много вещества от околната среда, включително и антимикробни агенти (Teapaisan et al., 2017). Резултатите са представени на Таблица 2 и Таблица 3.

Изолираните съединения катехин (2), геин (3), нига-ичигозид F1 (4), торментикова киселина (5), 3,3'-ди-О-метилелагова киселина-4-О- β -D-глюкопиранозид (6) и 3-О-метилаелагова киселина-3'-О- α -3''-О-ацетилрамнопиранозид (7) бяха тествани срещу *S. aureus* NBIMCC 3359, *P. aeruginosa* NCTC 6749, *E. coli* SAIMC WF+ и *C. albicans* SAIMC 562 (Таблица 4).

С цел определяне на инхибиращия ефект срещу някои бактериални фенотипове (кворум сенсинг) на петрол етерни, EtOAc и *n*-BuOH екстракти бяха определени и МИК върху *P. aeruginosa* ATCC 15692 (PA01) (Таблица 5).

5.2. Определяне на бактериална дехидрогеназна активност

Стойностите на бактериална ДЕНА активност, след третиране с екстрактите, са определени чрез МТТ-тест. ДЕНА активността не беше определена за *P. aeruginosa* PA01, тъй като протокола на работа не го изисква. Този метод се основава на принципа, че ДЕНА ензимите се произвеждат от всички живи клетки и анализа може да бъде свързан с броя на наличните живи бактерии. В случаите, когато не е установен инхибиторен или бактерициден ефект за съответния екстракт, стойностите от респираторната активност са еквивалентни на нетретираната контрола и не са представени в Таблица 2 и Таблица 3. Резултатите са представени като процент витални клетки $\pm$ стандартно отклонение (SD).

Таблица 2. МИК/МБК на MeOH, петрол етерни и EtOAc екстракти, получени от *G. urbanum* и бактериална ДЕНА активност

Тест-бактерии	Параметри	Екстракти					
		MeOH		Петрол етерни		EtOAc	
		Надземни части	Корени	Надземни части	Корени	Надземни части	Корени
<i>S. aureus</i> NBIMCC 3359	МИК [mg/ml]	0.625	2.5	2.5**	2.5	0.078	0.156
	ДЕНА* (% $\pm$ SD)	8.8 $\pm$ 2.2	20 $\pm$ 7.6	15 $\pm$ 1	15.8 $\pm$ 1.1	20.8 $\pm$ 2.2	47.5 $\pm$ 2.4
	МБК [mg/ml]	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5
<i>S. aureus</i> ATCC 6538 P	МИК [mg/ml]	0.625	2.5	1.25	1.25	0.313	1.25
	ДЕНА (% $\pm$ SD)	2.6 $\pm$ 0.6	54.1 $\pm$ 2	14 $\pm$ 1.0	15 $\pm$ 1	21.5 $\pm$ 2.6	34.9 $\pm$ 2.7
	МБК [mg/ml]	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5
MRSA NBIMCC 8327	МИК [mg/ml]	2.5	>2.5	>2.5	0.313	0.039	0.313
	ДЕНА (% $\pm$ SD)	28.1 $\pm$ 0.1	—	—	4.2 $\pm$ 0.3	16.6 $\pm$ 1.1	6.9 $\pm$ 0.4
	МБК [mg/ml]	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5
<i>S. epidermidis</i> NBIMCC 1093	МИК [mg/ml]	2.5	>2.5	>2.5	1.25	0.039	1.25
	ДЕНА (% $\pm$ SD)	25.4 $\pm$ 1.9	—	—	15.23 $\pm$ 1.9	14.05 $\pm$ 2.7	47 $\pm$ 1.4
	МБК [mg/ml]	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5
<i>B. cereus</i> ATCC 9634	МИК [mg/ml]	2.5	2.5	>2.5	2.5	0.078	0.156
	ДЕНА (% $\pm$ SD)	31 $\pm$ 0.5	39.9 $\pm$ 1.8	—	30.3 $\pm$ 1.3	28.9 $\pm$ 0.05	26.2 $\pm$ 1.4
	МБК	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	0.625	0.625

	[mg/ml]						
	ДЕНА (% ± SD)	—	—	—	—	0	1.9 ± 0.5

Легенда: * - Тестът за определяне на ДЕНА се отнася до ензима NADH; ** - 2.5 mg/ml е най-високата тествана концентрация

Таблица 3. МИК/МБК на *n*-BuOH, 20% EtOH и dH₂O екстракти, получени от *G. urbanum* и бактериална ДЕНА активност

Тест-бактерии	Параметри	Екстракти						Контрола
		<i>n</i> -BuOH		20% EtOH		dH ₂ O		Гентамицин [mg/L]
		Надземни части	Корени	Надземни части	Корени	Надземни части	Корени	
<i>S. aureus</i> NBIMCC 3359	МИК [mg/ml]	0.156	1.25	0.625	>2.5	0.625	2.5	0.0312
	ДЕНА (% ± SD)	58.6 ± 3.4	47.9 ± 3.2	59.9 ± 3.6	—	59 ± 2	50.5 ± 1.2	
	МБК [mg/ml]	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	
<i>S. aureus</i> ATCC 6538 P	МИК [mg/ml]	0.313	0.625	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	0.125
	ДЕНА (% ± SD)	41 ± 0.09	42.2 ± 5.7	—	—	—	—	
	МБК [mg/ml]	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	
MRSA NBIMCC 8327	МИК [mg/ml]	0.156	0.156	1.25	>2.5	1.25	1.25	0.125
	ДЕНА (% ± SD)	40.6 ± 2	37 ± 0.4	13 ± 3.8	—	—	—	
	МБК [mg/ml]	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	
<i>S. epidermidis</i> NBIMCC 1093	МИК [mg/ml]	0.078	0.156	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	0.0312
	ДЕНА (% ± SD)	40.9 ± 7.1	38 ± 5.4	—	—	—	—	
	МБК [mg/ml]	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	
<i>B. cereus</i> ATCC 9634	МИК [mg/ml]	0.078	0.078	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	0.125
	ДЕНА (% ± SD)	45.7 ± 2.8	51.4 ± 2.4	—	—	—	—	
	МБК [mg/ml]	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	

EtOAc екстракти (Таблица 2) демонстрираха най-ниски стойности на МИК (0.039 – 1.25 mg/ml) срещу тестваните бактериални щамове от род *Staphylococcus* и вид *B. cereus*, последвани от *n*-BuOH (0.078 – 1.25 mg/ml) (Таблица 3). В концентрации 0.625 mg/ml EtOAc фракции показаха бактерициден ефект срещу *B. cereus* и бактериалната ДЕНА активност показва стойности между 0 – 1.9%. От направения

анализ се установи, че MeOH са по-активни от петрол етерните екстракти, но имат по-високи МИК от EtOAc и *n*-BuOH екстракти (Таблица 2). Фракциите от надземни части, екстрахирани с dH₂O и 20% EtOH показаха инхибиращ ефект единствено срещу *S. aureus* NBIMCC 3359 и MRSA и то при доста високи концентрации (0.625 – 1.25 mg/ml) (Таблица 3). Получените резултати се потвърждават от предходни проучвания, които показват, че екстракцията с органични разтворители осигурява по-висок афинитет за извличане на антимикробни съединения, в сравнение със слабо алкохолните и H₂O екстракти (Darah et al., 2014).

Таблица 4. МИК и МБК на изолираните съединения (mg/ml)

Съединения / тест-бактерии	<i>S. aureus</i> NBIMCC 3359	<i>P. aeruginosa</i> NCTC 6749	<i>E. coli</i> SAIM WF+	<i>C. albicans</i> SAIM 62I
Катехин (2)	0.25**	0.5**	>2.5	>2.5
Торментикова киселина (5)	0.125*	>2,5	>2.5	0.5*

Легенда: * - бактериостатичен ефект; ** - бактерициден ефект

От всички тествани чисти съединения единствено торментиковата киселина (5) прояви микробостатичен ефект срещу *S. aureus* и *C. albicans*, докато катехина (2) показва бактерицидна активност срещу *S. aureus* и *P. aeruginosa* (Таблица 4).

Геинът (3) е фенолен глюкозид от групата на фенилпропаноидите (Piwowarski et al., 2014a). Изолиран е преди от *G. iranicum* (Shahani et al., 2012), *G. japonicum* (Shigenaga et al., 1985) и *G. urbanum* (Herrissey and Cheymol, 1925). До момента няма информация в достъпната литература, че проявява антибактериална активност (Shahani et al., 2012).

Нига-ичигозидът F1 (4) е тритерпенов глюкозид (Niero et al., 1999), който е изолиран преди от *G. rivale* (Panizzi et al., 2000) и *G. japonicum* (Gstirner and Widenmann, 1964; Shigenaga et al., 1985; Yoshida et al., 1985a). При проведените изследвания се установи, че той е неактивен срещу тестваните микроорганизми. Cheng и сътр. (2009) съобщават, че това съединение подобрява проявата на кардиогенната диференциация на ендогенния костен мозък, получен от мезенхимни стволови клетки. Също така има противовъзпалително и антиноцицептивно (болкоуспокояващо) действие, дължащо се на инхибиторния ефект върху съдовата проницаемост, отговорна

за възпалението (Choi et al., 2003). Също така облекчава чернодробната стеатоза в мъжки мишки, предизвикана от високо съдържание на мазнини, чрез активиране на защитния механизъм Nrf2 (Xia et al., 2018).

Торментиковата киселина **(5)** демонстрира антинеопластични, противовъзпалителни и антиатерогенни свойства (Jian et al., 2015; Loizzo et al., 2013; Wang et al., 2016). Според Jovel и сътр. (2007) торментиковата киселина не проявява антибактериална активност срещу MRSA. MeOH екстракт от *G. japonicum* проявява инхибиращ ефект срещу HIV-1 протеазата в концентрация 17.9 µg/ml с около 49% (Xu et al., 1996). Тя редуцира пролиферацията на мускулните клетки на гладките тъкани и преживяемост (Fogo et al., 2009) и инхибира липополизахарид-индуцираните iNOS, COX-2, and TNF-α експресии чрез инактивиране на ядрения фактор NF-κB в RAW 264.7 макрофаги (An et al., 2011). Тя инхибира IL-1β-индуцирана хондроцитна апоптоза чрез активиране на сигналния път на PI3K / Akt (Yang et al., 2018).

3,3'-ди-*O*-метилелагова киселина-4-*O*-β-*D*-глюкопиранозид **(6)** е изолиран по-рано от *G. japonicum* (Cheng et al., 2011), но до момента не са налични данни в литературата за неговата биологична активност. Той не прояви активност спрямо тестваните микроорганизми.

Двата изолирани ацетилрани рамнозиди на метилелаговата киселина са изолирани и идентифицирани от кората на стъблото на *Eucalyptus globulus* (Kim et al., 2001), но до сега не са били намирани в род *Geum*. Те инхибират липидната пероксидация в микрозомите на черния дроб в плъх (Kim et al., 2001). В настоящия дисертационен труд не се установи антимикробна активност на съединение **(7)**, в сравнение с рамнозидни производни на елаговата киселина, за които е известно, че инхибират образуването на стафилококови биофилми и намаляват антибиотичната резистентност (Quave et al., 2012).

Според някои автори, често отделните компоненти в суровите екстракти или фракции демонстрират високи антимикробни ефекти, когато се прилагат смесени заедно, което сочи за синергични взаимодействия (Eloff, 1998).

Екстракти	Части от <i>G. urbanum</i>	<i>P. aeruginosa</i> PA01
Петрол етерни	Надземни части	12.5
	Корени	6.25
EtOAc	Надземни части	6.25
	Корени	6.25
<i>n</i> -BuOH	Надземни части	12.5
	Корени	12.5

Таблица 5.
Определяне на МИК на петрол етерни, EtOAc и *n*-BuOH екстракти срещу *P. aeruginosa* PA01 (mg/ml)

5.3. Определяне на бактерицидната активност в динамика

От получените резултати (Таблица 2) се установи, че EtOAc екстракти от корени и надземни части в концентрации 625 µg/ml проявяват бактерициден ефект спрямо *B. cereus*. В проведен *in vitro* анализ бе определена неговата динамика в различни интервали на третиране (Таблица 6). Резултатите са представени като log₁₀ от КОЕ/ml и са базирани на конвенционалния бактерициден активен стандарт, който е 3 log₁₀ КОЕ/ml или по-голяма редукция в броя на преживелите бактерии.

Таблица 6. Определяне на бактерицидната активност на EtOAc екстракти в различни времеви интервали

Часове	Части на растението <i>G. urbanum</i>					
	Корени (log ₁₀)			Надземни части (log ₁₀)		
	1/4×МБК	1/2×МБК	МБК	1/4×МБК	1/2×МБК	МБК
0 h	4 ± 3.24	4 ± 3.31	4 ± 3.41	4 ± 2.05	4 ± 2.45	4 ± 2.98
4 h	3.9 ± 3.07	3.7 ± 2.4	3.2 ± 2.05	3.9 ± 2.35	3.7 ± 2.05	3.4 ± 2.02
12 h	3.5 ± 1.45	3.2 ± 2.8	1.8 ± 1.66	3.7 ± 2.23	3.3 ± 1.93	2.9 ± 1.63
24 h	2.6 ± 1.89	1.4 ± 0.85	0	3.7 ± 2.66	3.1 ± 2.3	1.6 ± 1.3

Средно намалението на броя на жизнените клетки в проведения експеримент след 24 h третиране с тестваните екстракти в концентрация МБК варира между $4 \log_{10}$ КОЕ/ml и $1.6 \log_{10}$ КОЕ/ml за EtOAc екстракт от надземни части и между $4 \log_{10}$ КОЕ/ml до нула КОЕ/ml за EtOAc екстракт от корените. Инхибирането на растежа и ефикасността на EtOAc екстракти са зависими от дозата и времето. Резултатите са в тясна връзка със степента на инхибиране, концентрацията на екстракта и тоталното фенолно съдържание в нея, тъй като е известно, че тези съединения са с липофилен характер и вероятно действат структурно и функционално върху цитоплазмената мембрана или нейните ензими, която става проницаема за протони и йони, губи целостта си (Araña-Cloutier et al., 2018), клетъчното съдържание изтича (Ikigai et al., 1993) и се генерират хидропероксиди ($\text{ROOH}\cdot$) от полифенолите (Ahmad Mahir and Ismail, 2017).

5.4. Определяне на действието на екстракти в комбинация с антибиотици

Както е известно, комбинираната антибиотична терапия също води до антибактериална резистентност. Синергизмът между използвани в клиничната практика антибиотици и растителни екстракти може да окаже благоприятни (синергично или адитивно взаимодействие) или вредни ефекти (антагонистичен или токсичен резултат). Въпреки богатата налична литература за антимикробните свойства на растителните екстракти, нито един от тях не се прилага успешно и до днес под формата на антибиотик (Gibbons, 2004).

От Таблица 2 се установи, че EtOAc екстракт от надземни части проявява най-силен антимикробен ефект срещу Грам-(+) бактерии. Поради това експериментите продължиха целенасочено с търсенето и доказването на синергизъм между тази фракция с клинично прилаганите антибиотици гентамицин и пеницилин срещу два щама от вид *S. aureus* (Таблица 7).

Таблица 7. Определяне на синергично действие между EtOAc екстракт от надземни части и клинично прилагани антибиотици

<i>S. aureus</i> NBIMCC 3359			
Показател	Пеницилин	EtOAc екстракт	Комбинация
МИК	0.0625 mg/L	0.156 mg/ml	0.0625 mg/L + 0.156 mg/ml
<i>S. aureus</i> ATCC 6538 P			
Показател	Пеницилин	EtOAc екстракт	Комбинация

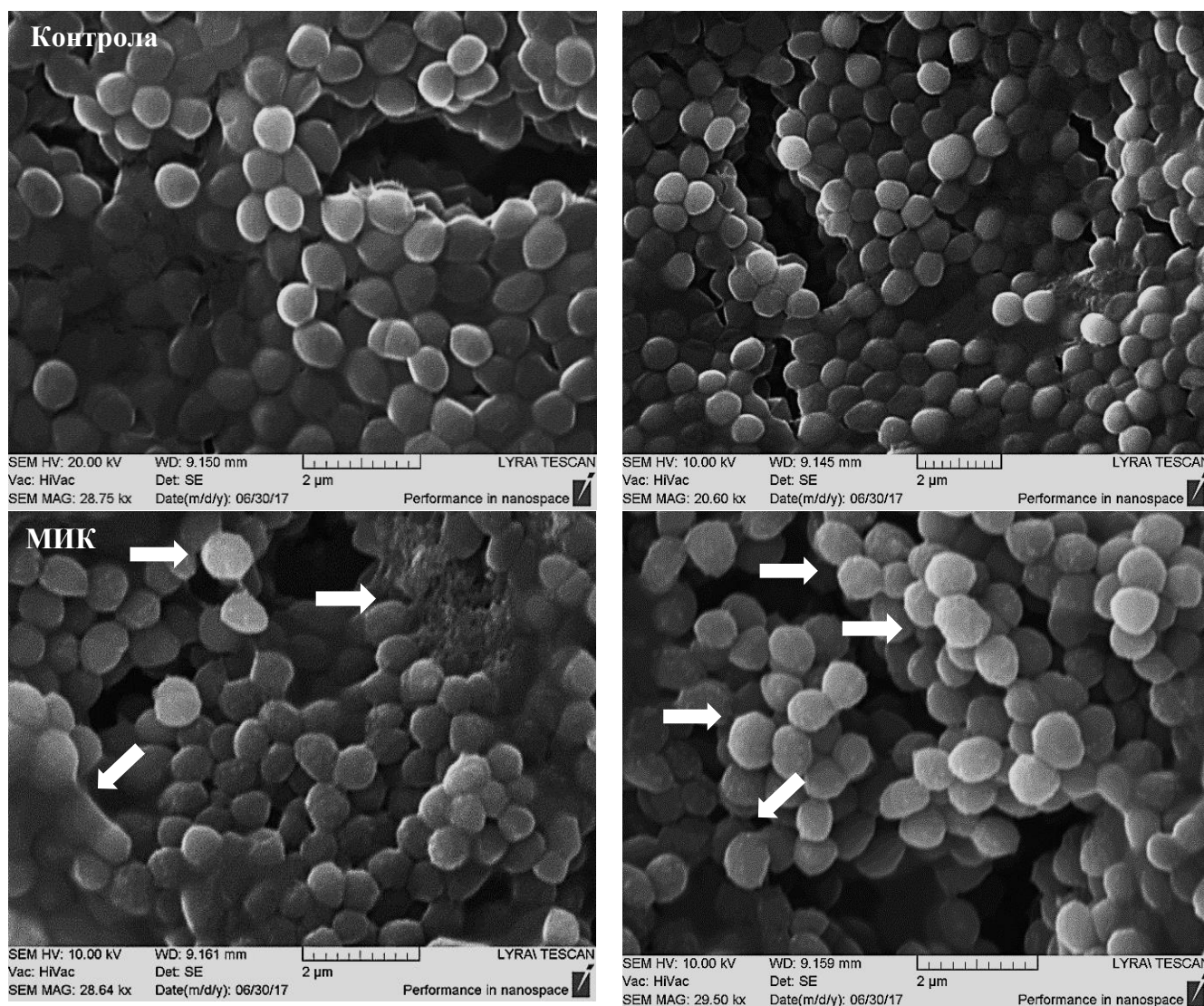
МИК	1 mg/L	1.25 mg/ml	0.5 mg/L + 1.25 mg/ml
Показател	Гентамицин	EtOAc екстракт	Комбинация
МИК	0.5 mg/L	1.25 mg/ml	0.5 mg/L + 1.25 mg/ml

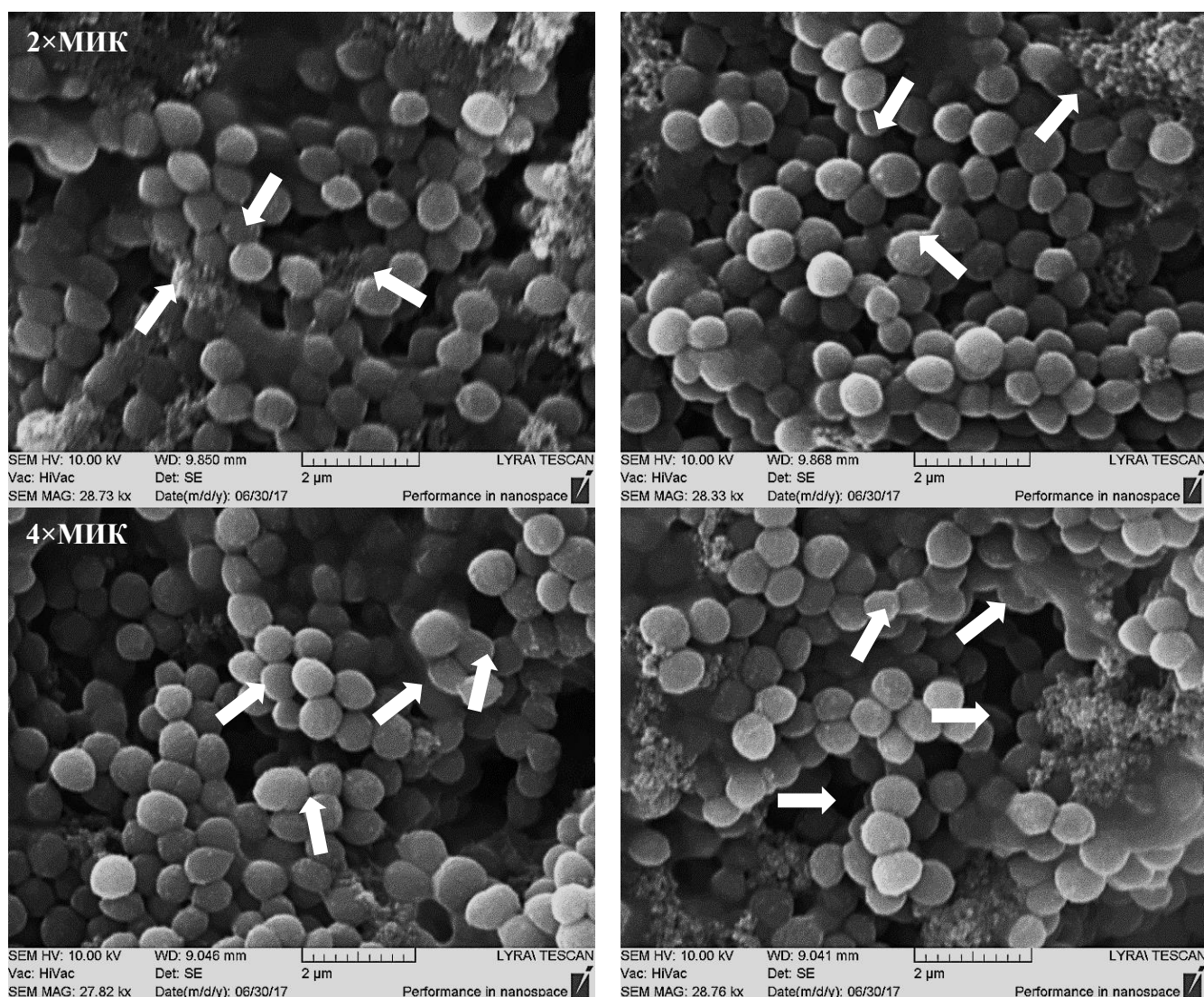
EtOAc екстракт от надземни части ($1 \times \text{МИК}$) проявява синергизъм към пеницилин, като намалява неговата доказана индивидуална доза двойно (от 1 mg/L до 0.5 mg/L) срещу пеницилин-резистентен щам от вид *S. aureus*.

5.5. Сканираща електронна микроскопия

Ефекта на EtOAc екстракт от надземни части беше определен върху клетъчната стена на MRSA чрез сканираща електронна микроскопия (Фигура 6).

Фигура 6. Сканираща електронна микроскопия на MRSA клетки, въздействани с различни дози от EtOAc екстракт от надземни части





Нетретираните MRSA клетки, някои от които са в процес на делене, се характеризират с типична коковидна форма и гладка повърхност на клетъчната стена. Някои от тях се делят асиметрично и поради това са с различна големина. След третиране на бактериалните клетки с EtOAc екстракт се наблюдават различни количества сферични образувания от порядъка на 0.1 μm по тяхната повърхност. В третираните проби се наблюдава и наличие на детритен материал. Уврежданията по клетъчната повърхност, както и образуваният детритен материал са означени със стрелки. Според литературните източници, активните компоненти на екстракта може би се свързват с клетъчната повърхност и след това проникват до таргетните места, вероятно чрез фосфолипидния бислой на цитоплазмената мембрана и мембранно-свързаните ензими. Деформацията на клетъчната структура може да бъде в резултат на увеличаването и дестабилизирането на мембраната, което води до увеличена мембранна флуидност, и следователно до пасивен пермеабилитет (Ultee et al., 2002).

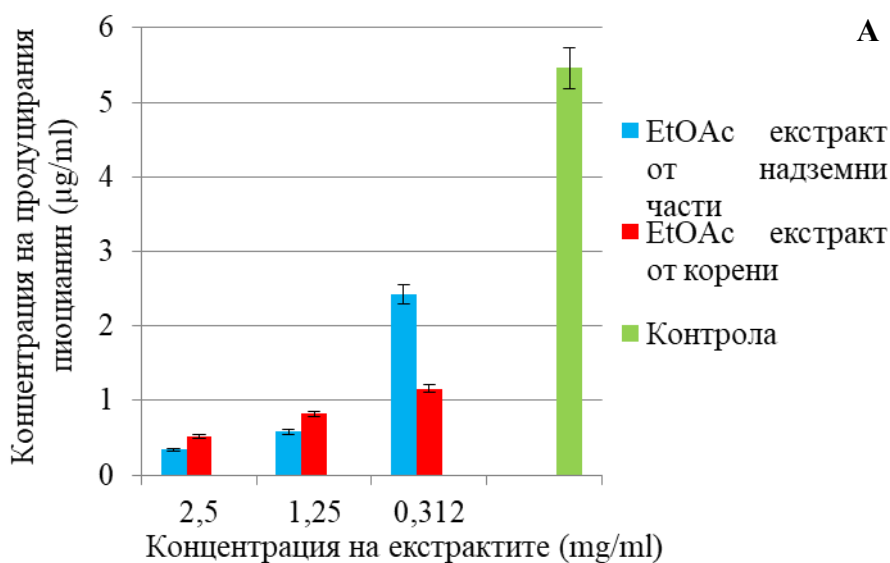
5.6. Определяне на инхибиращия ефект срещу бактериални фенотипове

Напоследък много изследователи насочват своите усилия към разработването на нови природни продукти, които да намалят бактериалната патогенност чрез инхибиране на кворум сенсинг системите на микроорганизмите. Кворум сенсинга или т. нар. бактериална междуклетъчна комуникация е бактериален отговор, зависим от клетъчната плътност. Той се медира от хормон-подобни съединения, наречени автоиндуктори (АИ), които се синтезират по време на определена фаза на растеж или в отговор на конкретни промени на околната среда. Когато бактериалната плътност се повиши се увеличава съответно и тяхната концентрация в средата. Те се свързват със сигнални рецептори, разположени на бактериалната повърхност (Грам-(+) бактерии) или в цитоплазмата (Грам-(-) бактерии). Това води до активиране на кворум сенсинг-зависимата генна експресия, която контролира голямо разнообразие от фенотипове, включително синтез на пиоцианин, подвижност, образуване на биофилм, резистентност към лекарства и др. Следователно, инхибирането на тази система се счита за нова обещаваща цел на антимикробния път, като например антивирулентни съединения, които потискат генната експресия, съществена за основния метаболизъм *in vitro*, вместо самите микроорганизми (Yin et al., 2015).

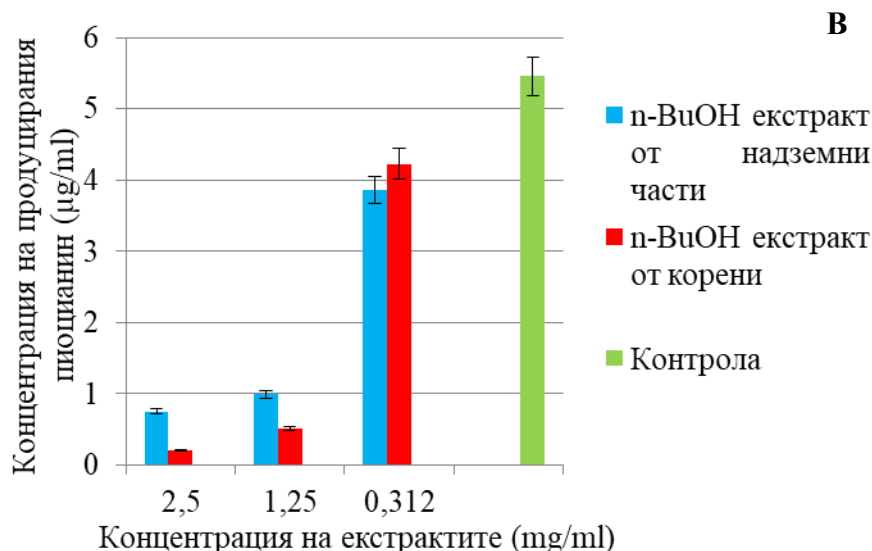
5.6.1. Потискане на синтеза на пиоцианин

Бактериите от род *Pseudomonas* произвеждат разнообразни извънклетъчни пигменти, от които най-значими са феназините. Основна характеристика на *P. aeruginosa* е синтеза на водоразтворимото синьо-зелено феназиново съединение пиоцианин. Кворум сенсинг системата на *P. aeruginosa* PAO1 се състои основно от две системи: Las и RhI. Подвижността и синтеза на пиоцианин, отговорни за причиняването на бактериални инфекции и образуването на биофилм, се регулират от RhI системата (Vandeputte et al., 2010).

Експериментът беше проведен с избрани суб-МИК на активните EtOAc (Фигура 7A) и *n*-BuOH (Фигура 7B) екстракти от корени и надземни части на *G. urbanum*, вариращи от 0.312 до 2.5 mg/ml срещу експресията на гена, отговорен за синтеза на пигмента пиоцианин.



А **Фигура 7.** Инхибиторен потенциал на EtOAc (А) и *n*-BuOH (В) екстракти срещу синтеза на пиоцианин

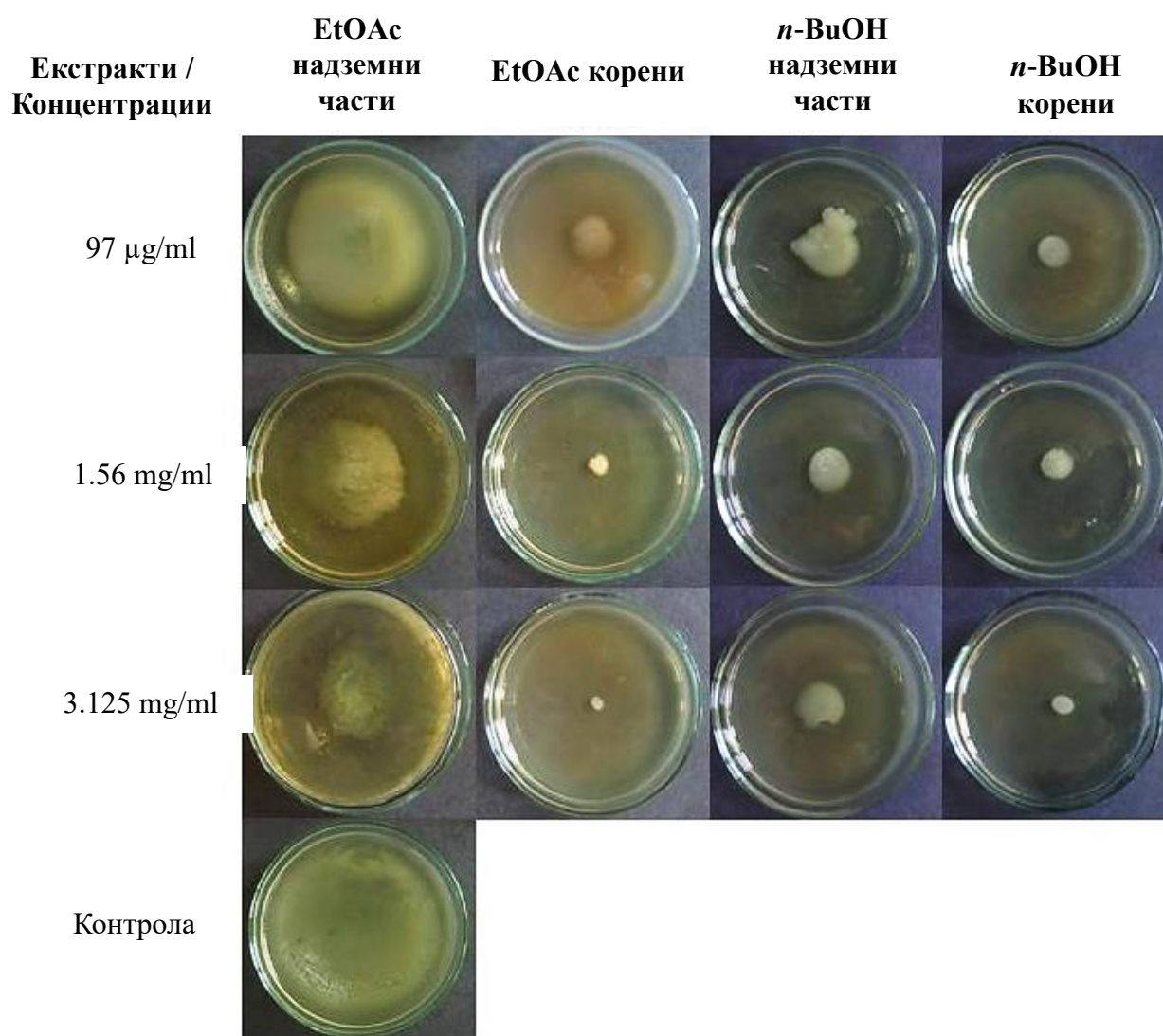


От направеният анализ се установи, че изследваните екстракти значително потискат един от фенотиповете на псевдомонасите. *N*-BuOH екстракт от корени инхибира количеството на продуцирания пиоцианин с около 96% в най-високата си концентрация (Фигура 7В), последван от EtOAc фракция от надземни части, която потиска синтеза му с приблизително 94% (Фигура 7А). Останалите два екстракта инхибират количеството на пигмента между 86 – 90% (2.5 mg/ml), в сравнение с нетретираната контрола. В най-ниската тествана концентрация (312 µg/ml) EtOAc екстракт от корени потиска с около 4 пъти синтеза на пиоцианин, докато при *n*-BuOH екстракти тази продукция е инхибирана сравнително малко (около 1 път), в сравнение с невъздействани бактериални клетки.

5.6.2. Потискане на подвижност

Беше определен инхибиторния ефект на EtOAc и *n*-BuOH екстракти в избрани концентрации (суб-МИК), вариращи от 97 $\mu\text{g/ml}$ до 3.125 mg/ml, върху подвижността на *P. aeruginosa* PA01 (Фигура 8).

Фигура 8. Определяне на подвижността на *P. aeruginosa* PA01



Зоната на подвижност на *P. aeruginosa* PA01 в най-ниската концентрация (97 $\mu\text{g/ml}$) на EtOAc фракцията от надземни части бе 6 cm и се приближава с тази на контролата – 7 cm. С увеличаване концентрацията на тази фракция наблюдаваната подвижност намалява. EtOAc екстракт от корени показва най-висок инхибиторен ефект в концентрация 3.125 mg/ml (0.5 cm), последван от *n*-BuOH фракции (1 – 2 cm). Както се очакваше, петрол етерните екстракти не повлияват подвижността на *P. aeruginosa* PA01. Инхибирането на подвижността и пиоцианиновия синтез, без да се инхибира

бактериалния растеж, вероятно се дължи на наличието на *rhl* инхибитор в EtOAc и *n*-BuOH екстракти.

5.6.3. Потискане на биофилм образуване

S. aureus използват Agr и RAP/TRAP системите за регулиране на тяхната вирулентност. Възможно е те да взаимодействат помежду си, но до момента този механизъм не е достатъчно добре проучен. Двете системи контролират RNAIII и следователно регулират транскрипцията на гени, включени в адхезията и вирулентността (Brackman and Coenye, 2015). Повече от 80% от микроорганизмите в природата живеят в биофилми, като те са над 100 пъти по-толерантни към антибиотици, биоциди и тежки метали, в сравнение с неадхерентните „свободни“ клетки (Rasmussen and Givskov, 2006). Експресията на *agr* и RNAIII играят важна роля върху образуването на биофилм, като регулират придържането му към фибронектин и ендотелни клетки в поточни условия, но намаляват адхезията му към полистирен и фибриноген при статични такива.

Ефекта на EtOAc екстракт от надземни части беше определен върху образуването на биофилм от трите тест-щама *S. aureus* (Таблица 8). Алтернативна антипатогенна стратегия представлява инхибирането на тази система в концентрации, неподтискащи растежа на бактериите (Brackman and Coenye, 2015). Поради тази причина анализът се извърши в такива концентрации, които биха могли да предотвратят биофилмовото образуване или адхезията на бактериите, без да оказват натиск към развитието на стафилококова резистентност.

Таблица 8. Определяне ефекта на EtOAc екстракт от надземни части срещу образуването на стафилококов биофилм

EtOAc [$\mu\text{g/ml}$]	<i>S. aureus</i> NBIMCC 3359	<i>S. aureus</i> ATCC 6538 P	MRSA
312.5	—	70.2 ± 3.3	—
156.25	—	13.6 ± 1.02	—
78.125	67.22 ± 2.3	13.2 ± 4.6	—
39.06	65.13 ± 5.05	12.8 ± 2.05	52.5 ± 5.5
19.5	47.31 ± 3.04	12.8 ± 3.03	11.7 ± 3.01
9.76	43.64 ± 3.01	11.16 ± 1.01	7.2 ± 2.05

4.88	43.6 ± 4.02	10.75 ± 1.8	6.2 ± 2.04
2.44	43.23 ± 1.03	10.75 ± 2.01	4.34 ± 1.7
1.22	42.28 ± 1.01	10.6 ± 1.01	3.3 ± 1.03
0.61	38.7 ± 3.4	9.49 ± 1.04	0.66 ± 1.01

Легенда: Резултатите са представени като процент инхибиране на бактериалната адхеренция ± SD.

EtOAc екстракт от надземни части най-силно инхибира образування биофилм от *S. aureus* NBIMCC 3359, като дори в $1/128 \times \text{МИК}$ инхибирането е около 40%. В сравнение, в концентрация $1/2 \times \text{МИК}$ EtOAc екстракт инхибира адхеренцията на останалите два щама средно с около 12.65%.

5.7. Определяне на противовирусния ефект на екстракти

MeOH, EtOAc и *n*-BuOH екстракти бяха анализирани за противовирусен ефект срещу Коксаки вирус В1, щам Connecticut (CVB1); Коксаки вирус В3; Човешки аденовирус тип 5 (HAdV5); Полиовирус тип 1; Човешки респираторен синцитиален вирус А2; *Herpes simplex* тип 1 (HSV-1).

Таблица 9. Противовирусен ефект на селектирани екстракти

Фракция	Цитотоксичност CC50 (µg/ml)		CVB1		HAdV5		HSV-1	
	HEp-2	MDBK	IC ₅₀ (µg/ml)	SI	IC ₅₀ (µg/ml)	SI	IC ₅₀ (µg/ml)	SI
MeOH надземна част	50	220	NA	–	NA	–	24.7	8.9
MeOH корени	83.5	1200	NA	–	30	2.7	224.5	5.3
EtOAc надземна част	58.5	88.6	57	1.07	10	5.8	NA	–
EtOAc корени	39.7	320	NA	–	2.2	18	NA	–
<i>n</i> -BuOH надземна част	167	1050	NA	–	NA	–	54	19.4

<i>n</i> -BuOH корени	63	962	NA	–	NA	–	28.3	34
--------------------------	----	-----	----	---	----	---	------	----

Легенда: NA – няма активност и следователно индекса на селективност (SI) няма стойност

Изследваните екстракти показаха противовирусна активност срещу CVB1, HAdV5 и HSV-1. С най-високи SI се характеризират *n*-BuOH екстракти срещу HSV-1. EtOAc екстракт от корени показва средна стойност на селективност срещу HAdV5. Останалите екстракти имат ниски стойности на SI. HSV са ДНК вируси, принадлежащи към сем. *Herpesviridae* и са отговорни за различни леки до тежки заболявания, които понякога са животозастрашаващи, особено при имунокомпрометирани пациенти (Wilhelmus, 2015). До момента не е проучен антивирусния потенциал на *G. urbanum*. Известно е, че екстракт от *G. japonicum* подтиска HSV самостоятелно ($EC_{50} = 52.8 \mu\text{g/ml}$) и в комбинация с ацикловир ($EC_{50} = 1.1 \mu\text{g/ml}$) (Kurokawa et al., 1995).

6. Определяне на цитотоксичен и антинеопластичен ефект на екстракти и съединения

Канцерогенезата включва сложен набор от признаци и симптоми, при който възпалителните и инфекциозни заболявания играят съществена роля. Бактериите и вирусите най-често поразяват кожата и лигавиците, храносмилателната система, белите дробове и дихателните пътища, пикочната и нервната система и т.н. (A.C.S., 2015a). Ето защо в хода на експерименталната дейност бяха селектирани такива концентрации, които да повлияват на бактериите и туморните клетки, без да оказват влияние на нормалните.

6.1. Цитотоксичен ефект върху клетъчна линия HEK-293

Стойностите на IC_{50} на тестваните екстракти (Таблица 10) и изолираните съединения (Таблица 11) (с изключение на (1), (6) , (8) и (9) тъй като намяше достатъчно количества от тях) бяха изчислени и представени след логаритмуване на приложените концентрации с помощта на софтуерната програма GraphPad Prism. Интервалите на достоверност (95% CI) са дадени в таблицата под стойностите на IC_{50} ($\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$).

Таблица 10. Цитотоксичен потенциал на екстракти от *G. urbanum* върху клетъчна линия НЕК-293

Време на инкубация / показател		MeOH [$\mu\text{g/ml}$]		Петрол етерни [$\mu\text{g/ml}$]		EtOAc [$\mu\text{g/ml}$]	
		Надземни части	Корени	Надземни части	Корени	Надземни части	Корени
24 h	IC ₅₀	–	–	45.76 $\pm$ 1.43	42.34 $\pm$ 0.5	805.1 $\pm$ 0.1	188.7 $\pm$ 7
	95% CI	–	–	35.95 – 58.25	38.68 – 46.35	502.1 – 1293	135.3 – 263.2
48 h	IC ₅₀	91.2 $\pm$ 1.1	121.9 $\pm$ 1.2	28.21 $\pm$ 0.8	35.98 $\pm$ 1.8	128.7 $\pm$ 0.09	43.02 $\pm$ 2
	95% CI	76.2 – 109.3	94.4 – 157.4	23.01 – 34.58	25.1 – 51.56	84.8 – 195.5	39.65 – 46.67
72 h	IC ₅₀	55.5 $\pm$ 0.5	54.6 $\pm$ 0.3	95.35 $\pm$ 5.7	34.49 $\pm$ 0.7	62.27 $\pm$ 0.1	102.8 $\pm$ 3
	95% CI	44.2 – 66.9	44.6 – 66.9	54.88 – 165.6	34.36 – 45.38	60.59 – 98.07	90.51 – 116.9
Време на инкубация / показател		<i>n</i> -BuOH [$\mu\text{g/ml}$]		dH ₂ O [$\mu\text{g/ml}$]		20% EtOH [$\mu\text{g/ml}$]	
		Надземни части	Корени	Надземни части	Корени	Надземни части	Корени
24 h	IC ₅₀	640 $\pm$ 6	722.7 $\pm$ 4	560.8 $\pm$ 14.5	476.9 $\pm$ 7.1	>1000	>1000
	95% CI	479.7 – 853.8	606.9 – 860.6	400.2 – 786	389.4 – 584.1	-	-
48 h	IC ₅₀	143.7 $\pm$ 3	128.2 $\pm$ 2	121.3 $\pm$ 7	151.6 $\pm$ 4.8	405.2 $\pm$ 4.7	282 $\pm$ 4.6
	95% CI	127.2 – 162.3	115.6 – 142.3	68.93 – 213.6	109.7 – 209.5	355.6 – 461.7	231.6 – 343.3
72 h	IC ₅₀	141.6 $\pm$ 1	115.6 $\pm$ 1	315.4 $\pm$ 5.1	225.5 $\pm$ 2.9	379.6 $\pm$ 7.4	295.8 $\pm$ 5.5
	95% CI	132.4 – 151.3	108.7 – 122.9	265.8 – 374.1	196.1 – 259.4	295.7 – 487.8	238.4 – 366.2

При MeOH, EtOAc и *n*-BuOH екстракти на изследваното растение се наблюдава сигнификантна зависимост време-отговор и концентрация-отговор в рамките на всеки един от тестваните периоди на въздействие, т.е. запазва се тенденцията за увеличаване на цитотоксичността с увеличаване на времето на третиране и приложената концентрация. Изключение прави EtOAc екстракт от корени, при който клетките на 72^{ия} h възвръщат виталността си. Най-силна цитотоксичност показаха петрол етерните екстракти от корени и надземни части като още на 24^{ия} h IC₅₀ стойностите намаляват до средно 44.05 µg/ml, а на 48^{ия} h стойностите на IC₅₀ се редуцират почти двойно. Между 48^{ия} h и 72^{ия} h след третиране с петрол етерен екстракт от корени не се наблюдава разлика в стойностите на IC₅₀ и тъй като този екстракт е силно цитотоксичен спрямо нормалните клетки не е подходящ модел за бъдещи проучвания. EtOAc екстракт от надземни части се характеризира с IC₅₀ 62.27 µg/ml и е по-малко токсичен от MeOH и петрол етерния екстракт от корени. Екстрактите, получени с dH₂O не се оказаха цитотоксични, тъй като на 72^{ия} h след третиране жизнеспособността на клетките се възстановява. 20% EtOH екстракти се характеризират с най-ниска цитотоксичност спрямо тестваната клетъчна линия и при трите интервала на отчитане, в сравнение с останалите екстракти, и поради това не са от интерес за бъдещи проучвания.

Таблица 11. Цитотоксичност на изолирани индивидуални съединения върху клетъчна линия НЕК-293

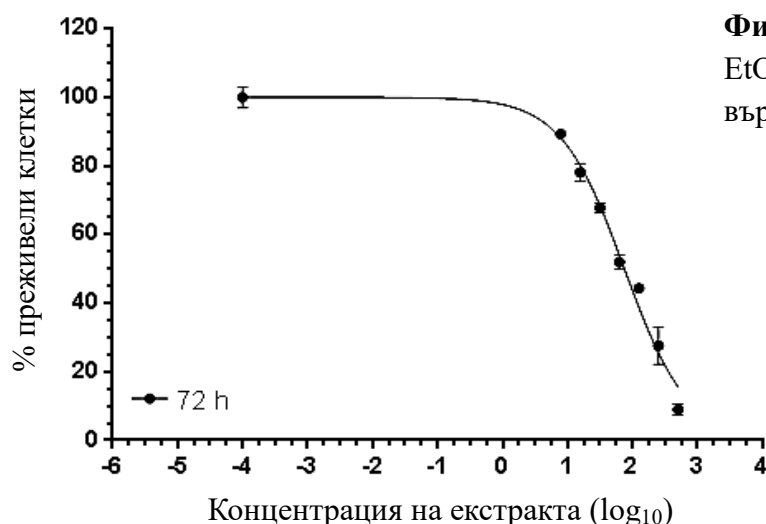
Време на инкубация / показател		Изолирани съединения от EtOAc екстракт от надземни части (µg/ml)				
		Катехин (2)	Геин (3)	Нига-ичигозид F1 (4)	Торментикова киселина (5)	3- <i>O</i> -метил елагова киселина-3'- <i>O</i> -α-3"- <i>O</i> -ацетилрамно-пиранозид (7)
24 h	IC ₅₀	> 1000	> 1000	1017 ± 10.1	> 250	565.8 ± 7.2
	95% CI	–	–	885.1 – 1168	–	481.2 – 665.3
48 h	IC ₅₀	> 1000	> 1000	818.7 ± 5.3	22.78 ± 1.6	545.1 ± 3.9
	95% CI	–	–	750.9 – 892.7	21.52 – 24.11	497.4 – 597.4
72 h	IC ₅₀	> 1000	> 1000	3460 ± 124.9	21.03 ± 2.3	881.3 ± 9.3
	95% CI	–	–	1911 – 6264	19.7 – 22.46	763.6 – 1017

Катехинът (2) и геинът (3) не са цитотоксични спрямо НЕК-293 (1000 µg/ml беше най-високата тествана концентрация и не е възможно да бъдат изчислени

стойностите на IC_{50} и 95% CI). Съединенията нига-ичигозид F1 (**4**) и 3-О-метилелагова киселина-3'-О- α -3''-О-ацетилрамнопиранозид (**7**) проявяват слаба цитотоксичност спрямо клетъчната линия НЕК-293, като в крайните интервали на отчитане (72^{ри} h) броя на жизнеспособните клетки се увеличава спрямо предходните (24^{ти} и 48^{ми} h). Торментиковата киселина (**5**) показва най-висока цитотоксичност върху НЕК-293 (250 μ g/ml беше най-високата тествана концентрация), дори и в сравнение с изпитваните екстракти. Тя се характеризира с ниски средни инхибиращи концентрации на 48^{ми} и 72^{ри} h, без разлика в стойностите, т.е. няма зависимост време-отговор. При това съединение цитотоксичността е зависима от приложената концентрация.

6.2. Цитотоксичен ефект върху клетъчна линия CCL-1

EtOAc екстракт от надземни части беше изследван *in vitro* за кожна токсичност върху CCL-1 клетки на 72^{ия} h.

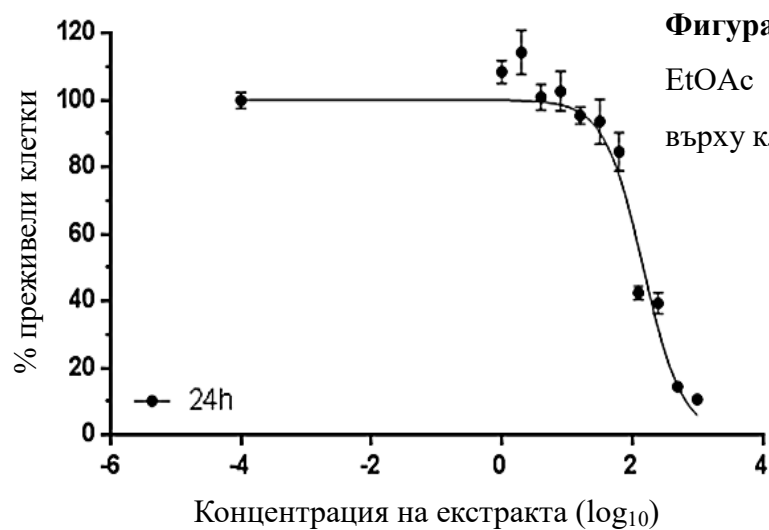


Фигура 9. Цитотоксичен ефект на EtOAc екстракт от надземна част върху клетъчна линия CCL-1

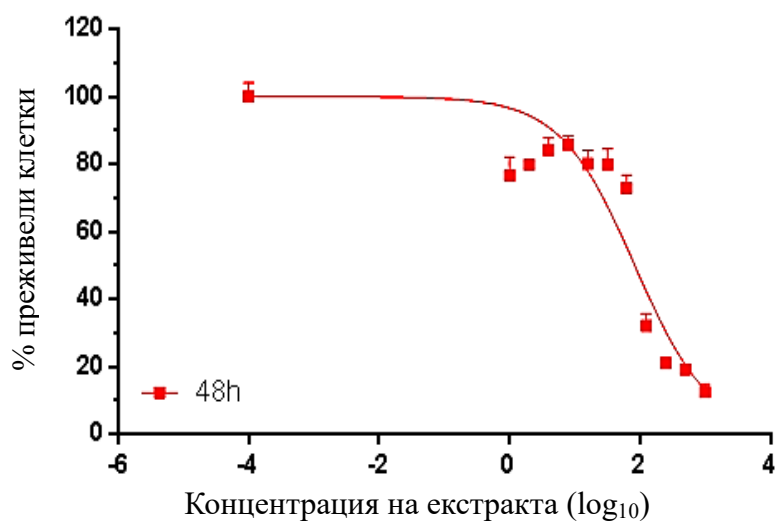
IC_{50} (μ g/ml), 72 h = 74.69 ± 1.05 (95% CI = 66.98 – 83.30)

Изследваният екстракт показва по-слаб цитотоксичен ефект върху фибробластите, в сравнение с нормалните бъбречни клетки НЕК-293 (Таблица 10), но въпреки това между стойностите на IC_{50} на 72^{ия} h не се открива съществена разлика.

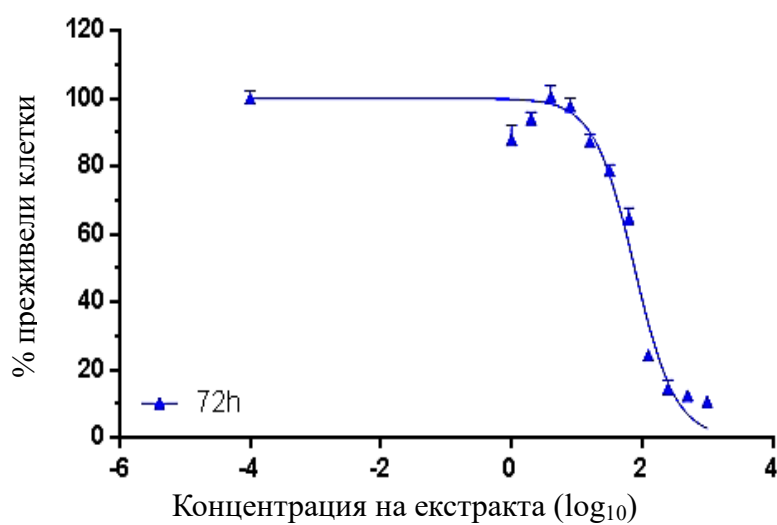
6.3. Цитотоксичен ефект върху клетъчна линия HEP-G2



IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$), 24 h = 147.9 ± 0.03 (95% CI = 128.5 – 170.4)



IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$), 48 h = 83.41 ± 0.06 (95% CI = 62.8 – 110)



IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$), 72 h = 77.11 ± 0.03 (95% CI = 68.33 – 87.03)

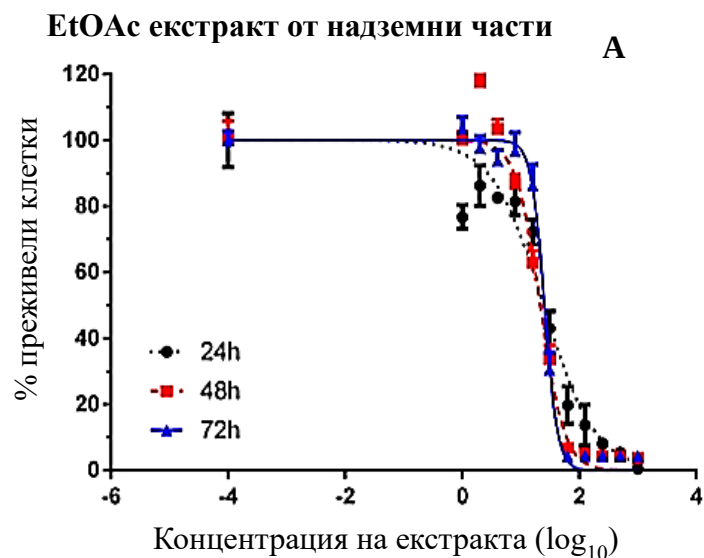
EtOAc екстракт от надземни части демонстрира по-слабо изразена цитотоксичност на 24^{ия} и 48^{ия} h върху хепатоцитните клетки, в сравнение с клетъчната линия HEK-293 (Таблица 10). Тъй като между стойностите на 72^{ия} h на IC₅₀ върху HEP-G2 (77.11 µg/ml) и HEK-293 (62.27 µg/ml) клетки не се открива съществена разлика, този екстракт беше селектиран за по-нататъшно проучване на способността му да индуцира апоптоза и да редуцира GSH в хепатоцитната клетъчна линия. Клетъчната линия HEP-G2 е високодиференцирана и произхожда от аденокарцином на черния дроб в стадий I. Поради това тя е морфологично и функционално по-близка до нормалните клетъчни линии (HEK-293 и CCL-1), отколкото към туморните клетъчни линии T-24 и BC-3C, и често се използва като модел за проучване на чернодробна токсичност и метаболизъм вместо първични хепатоцити.

6.4. Антинеопластичен ефект върху клетъчни линии T-24 и BC-3C

Екстрактите и изолираните съединения, които показаха цитотоксичност спрямо клетъчните линии HEK-293, CCL-1 и HEP-G2 бяха изследвани за антинеопластичен ефект върху две туморни клетъчни линии, модели за карцином на пикочен мехур в стадий 3 (T-24) и стадий 4 (BC-3C) от заболяването (Таблица 12 и Фигура 11, съответно Таблица 13 и Фигура 12). Подходящата начална гъстота на клетките при залагане на експеримент беше анализирана предварително от лабораторията, предоставила клетъчните линии. В съответствие с предоставената информация клетките бяха посявани в концентрация 7×10^4 КОЕ/ml. По-важните резултати са показани графично в линейна координатна система, като за целта стойностите на IC₅₀ бяха изчислени след логаритмуване на приложените концентрации с помощта на програмата GraphPad Prism.

Таблица 12. Антинеопластичен ефект на екстракти върху клетъчна линия Т-24

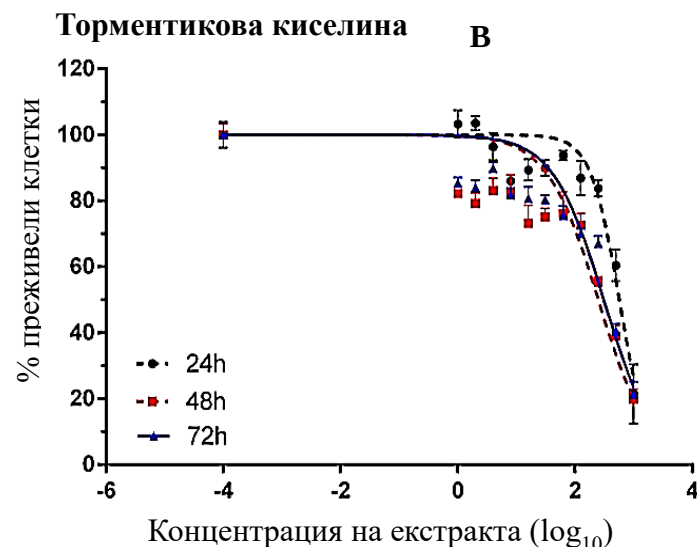
Време на инкубация		MeOH		Петрол етерен	EtOAc	n-BuOH		dH ₂ O	
		Надземни части	Корени	Надземни части	Корени	Надземни части	Корени	Надземни части	Корени
24 h	IC ₅₀	—	—	99.6 ± 0.02	93.21 ± 0.04	711 ± 0.03	554.6 ± 0.03	945.9 ± 24.8	809 ± 17.6
	95% CI	—	—	91.21 – 108.8	76.39 – 113.7	620.1 – 815.1	485.9 – 633	658.6 – 1358	598.5 – 1093
48 h	IC ₅₀	122.9 ± 0.04	345.4 ± 0.05	86.28 ± 0.02	67.06 ± 0.03	349 ± 0.03	299.5 ± 0.04	643.6 ± 22.6	470.6 ± 5.1
	95% CI	100.3 – 150.5	272.5 – 437.7	77.08 – 96.59	59.14 – 76.03	305 – 398.7	247.6 – 362.3	408.7 – 1013	410.7 – 539.3
72 h	IC ₅₀	78.7 ± 0.03	82.9 ± 0.04	70.15 ± 0.03	42.09 ± 0.01	192.7 ± 0.04	168.5 ± 0.03	555.8 ± 21.6	375.6 ± 11.4
	95% CI	69.4 – 89.2	70 – 98.3	60.59 – 81.23	39.32 – 45.06	162.6 – 228.3	145.1 – 195.8	308.4 – 1002	261.1 – 540.1



IC₅₀ (μg/ml), 24 h = 24.58 ± 0.04 (95% CI = 20.52 – 29.22)

IC₅₀ (μg/ml), 48 h = 21.47 ± 0.02 (95% CI = 19.55 – 23.62)

IC₅₀ (μg/ml), 72 h = 25.28 ± 0.01 (95% CI = 24.1 – 26.51)



IC₅₀ (μg/ml), 24 h = 567.3 ± 0.03 (95% CI = 502.2 – 640.8)

IC₅₀ (μg/ml), 48 h = 249.9 ± 0.05 (95% CI = 188.9 – 330.8)

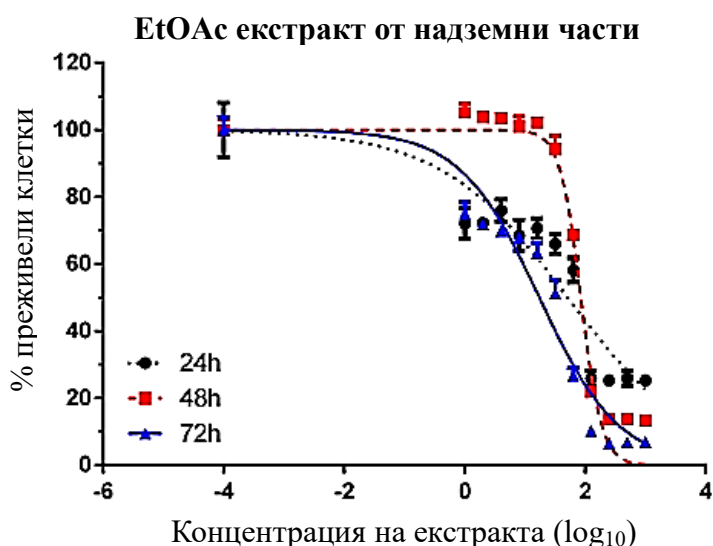
IC₅₀ (μg/ml), 72 h = 309.2 ± 0.035 (95% CI = 248.1 – 385.5)

Фигура 11. Антинеопластичен ефект на EtOAc екстракт от надземни части (A) и на торментикова киселина (5) (B) срещу клетъчна линия Т-24

Всички тествани екстракти върху Т-24 клетки, с изключение на този от EtOAc на надземни части, показват по-ниски стойности на IC_{50} , в сравнение с нормалните НЕК-293 клетки. Торментиковата киселина (**5**) е по-цитотоксична спрямо нормалната клетъчна линия (Таблица 11), отколкото върху туморната (Фигура 11В), и поради това не представлява подходящ модел за бъдещи проучвания, свързани с антинеопластична активност. Изследваните екстракти (Таблица 12) показват време-зависим ефект спрямо тестваната туморна клетъчна линия на всеки един от тестваните периоди на въздействие, като *n*-BuOH и dH₂O фракции от корени и надземни части демонстрираха най-слаб антинеопластичен ефект.

Таблица 13. Антинеопластичен ефект на екстракти върху клетъчна линия BC-3C

Време на инкубация / показател		EtOAc ($\mu\text{g/ml}$)	<i>n</i> -BuOH ($\mu\text{g/ml}$)	
		Корени	Надземни части	Корени
24 h	IC_{50}	423.4 ± 0.09	> 1000	> 1000
	95% CI	275.6 – 650.3	–	–
48 h	IC_{50}	340.2 ± 0.07	731 ± 0.03	547.2 ± 0.02
	95% CI	250 – 462.9	650.8 – 821	489.9 – 611.2
72 h	IC_{50}	23.38 ± 0.03	354.2 ± 0.02	313.2 ± 0.04
	95% CI	20.51 – 26.64	317.8 – 394.7	266.2 – 368.4



Фигура 12. Антинеопластичен ефект на EtOAc екстракт от надземни части върху клетъчна линия BC-3C

IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$), 24 h = 50.81 ± 0.07 (95% CI = 36.66 – 70.41)

IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$), 48 h = 84.54 ± 0.02 (95% CI = 77.72 – 91.97)

IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$), 72 h = 17.29 ± 0.05 (95% CI = 14.01 – 21.33)

Водните екстракти, както и 20% EtOH, чиито данни не са показани, не проявяват цитотоксичност спрямо туморната (BC-3C) и нормалната (HEK-293, Таблица 10) клетъчни линии и поради това и те не са от интерес за по-нататъшни изследвания. EtOAc екстракт от надземни части проявява цитотоксичност върху туморната клетъчна линия BC-3C в по-голяма степен (Фигура 12), отколкото върху трансформирани нормални бъбречни ембрионални клетки (Таблица 10) през трите интервала на отчитане на клетъчната виталност. На 24^{ия} h и 48^{ия} h този екстракт показва по-силен антинеопластичен ефект върху T-24 клетки (Фигура 11A), докато на 72^{ия} h той показва по-ниски стойности на IC₅₀ спрямо клетъчна линия BC-3C.

6.5. Определяне на индекс на селективност

EtOAc екстракти показаха по-слабо изразена цитотоксичност върху HEK-293 и CCL-1, отколкото върху туморните клетъчни линии: T-24 и BC-3C. Ето защо за тези екстракти бяха изчислени SI по отношение на туморните клетъчни линии (Таблица 14).

Таблица 14. Определяне на SI на EtOAc екстракти от *G. urbanum* спрямо адхерентни туморни клетъчни линии

Туморна клетъчна линия	Време на инкубация	Спрямо HEK-293		Спрямо CCL-1
		EtOAc екстракт от надземни части	EtOAc екстракт от корени	EtOAc екстракт от надземни части
T-24	24 h	32.75	2.02	—
	48 h	5.99	0.64	—
	72 h	2.57	2.45	2.95
BC-3C	24 h	15.84	0.45	—
	48 h	1.52	0.13	—
	72 h	3.83	4.4	4.32

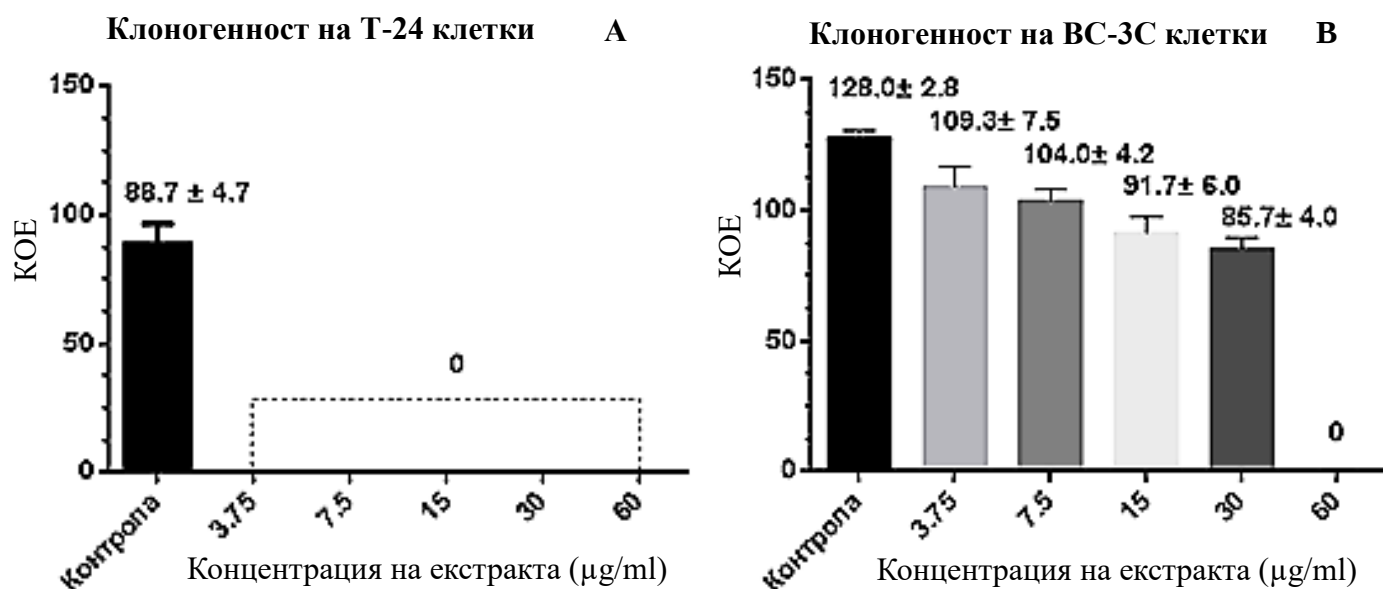
С най-висок SI на 24^{ия} h се характеризира EtOAc екстракт от надземни части върху T-24 клетки, последван от BC-3C. След 72 h инкубация, стойностите на SI при двата вида екстракти не показват статистически достоверни различия за тези клетки. По-високата стойност на SI означава, че екстракта проявява селективна цитотоксичност спрямо съответната туморна клетъчна линия. С най-нисък SI се характеризира екстракта от корени на 48^{ия} h срещу клетъчна линия BC-3C, като на 72^{ия} h се наблюдава

повишение на стойността. Ниски стойности на SI показва EtOAc екстракт от надземни части върху туморните клетъчни линии спрямо CCL-1.

6.6. Оценка на клетъчна клоногенна способност

Един от основните проблеми при терапията на туморните заболявания е оцеляващата клетъчна фракция, която запазва способността си да пролиферира въпреки проведеното лечение. Ето защо, е необходимо, освен тест за цитотоксичност, да се проведе и такъв за клетъчна клоногенност, който да отчита влиянието на въздействието върху дългосрочната способност на клетките да пролиферират. За целта бяха изследвани туморните T-24 и BC-3C клетки след третиране с EtOAc екстракт от надземни части като бе подбран диапазон от концентрации, както по-високи така и по-ниски от IC_{50} (Фигура 13).

Фигура 13. Клоногенност на T-24 (А и С) и BC-3C (В) клетки след третиране с EtOAc екстракт от надземни части за 48 h

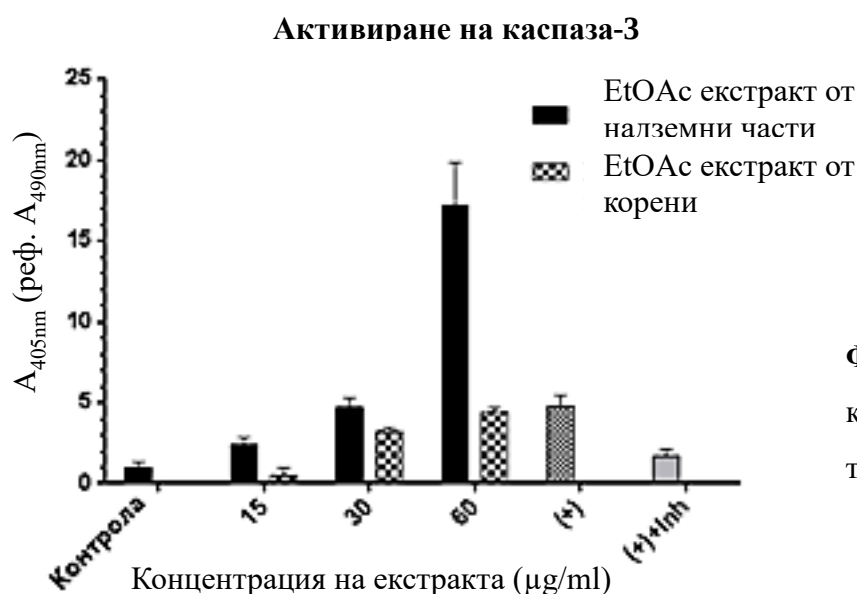


Проведеният тест показва, че T-24 клетки, третирани с концентрации между 3.75 µg/ml до 60 µg/ml не са запазили клоногенната си способност и не образуват колонии в полусолидна среда от метилцелулоза. Това е индикатор за наличието на антипролиферативен ефект на EtOAc екстракт от надземни части. Клетките в третираните проби не са се делили в рамките на 10-дневния период на култивиране и не са образували колонии, за разлика от тези в нетретираната контрола. Клетъчната линия BC-3C за разлика от T-24 запазва способността си да образува колонии, като клоногенността ѝ е потисната напълно едва при 60 µg/ml. Изглежда, че действието на

EtOAc екстракт зависи от стадия на заболяването и е по-силно изразен при клетки в по-нисък стадий. Ефектът и при двете клетъчни линии е дозо-зависим и се проявява при концентрации от 2 до 3 пъти по-ниски от IC_{50} за тестваните нормални клетъчни линии.

6.7. Тест за определяне нивата на каспаза-3

Отключването на програмирана клетъчна смърт в клетъчна линия Т-24 беше определено с помощта на търговски кит след третиране с EtOAc екстракт от надземни части и корени (Фигура 14).



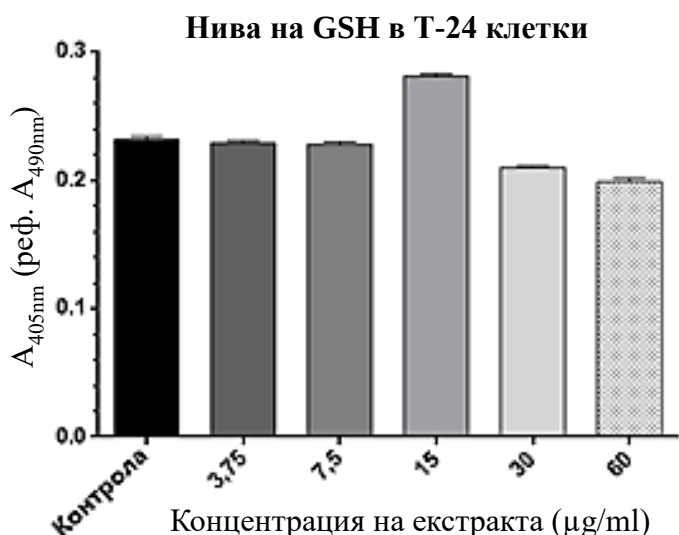
Фигура 14. Активиране на каспаза-3 в Т-24 клетки след третиране с EtOAc екстракти

От направеният анализ се установи, че нивата на каспаза-3 в Т-24 клетки се увеличават до 3 пъти след третиране с 60 µg/ml EtOAc екстракт от надземни части, отколкото в нетретираната контрола, което е маркер за протичаща апоптоза (фаза I).

6.8. Определяне нивата на клетъчен глутатион

6.8.1. Тест за редукция нивата на глутатион в клетъчна линия Т-24

Нивата на тотален GSH в Т-24 клетки бяха определени на 48^{ия} h след третиране с EtOAc екстракт от надземни части на *G. urbanum* (Фигура 15).



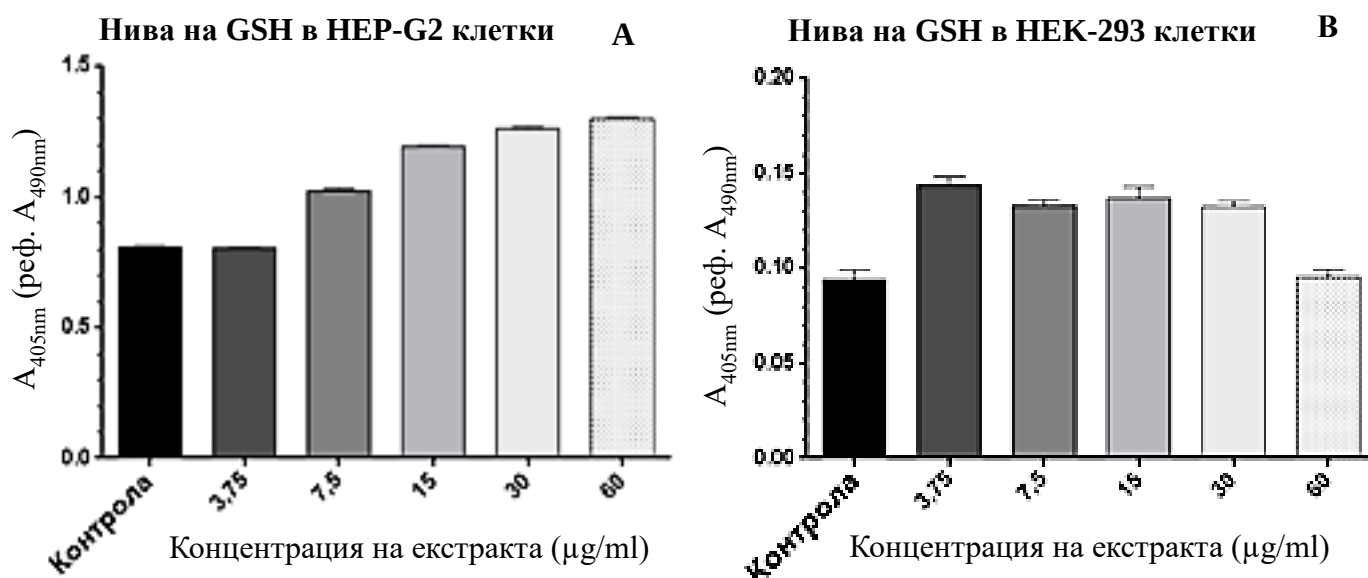
Фигура 15. Нива на
тотален GSH в T-24
клетки

При повишаване на концентрацията GSH намалява, което съвпада с индукцията на апоптоза и може да се обясни с понижаване на редукционния капацитет на клетката и абнормна генерация на свободни радикали. От литературните данни е известно, че нивата на тоталния GSH при малигнените клетки е значително по-висок, в сравнение с нормалните клетки (Фигура 16B).

6.8.2. Тест за редукция на глутатион в клетъчни линии HEP-G2 и HEK-293

Допълнително бяха установени общите нива на GSH в клетъчни линии HEP-G2 (Фигура 16A) и HEK-293 (Фигура 16B) след третиране с EtOAc екстракт от надземни части на 48^{ия} h.

Фигура 16. Нива на тотален глутатион в HEP-G2 (A) и HEK-293 (B) клетки след третиране за 48 h с EtOAc екстракт от надземни части

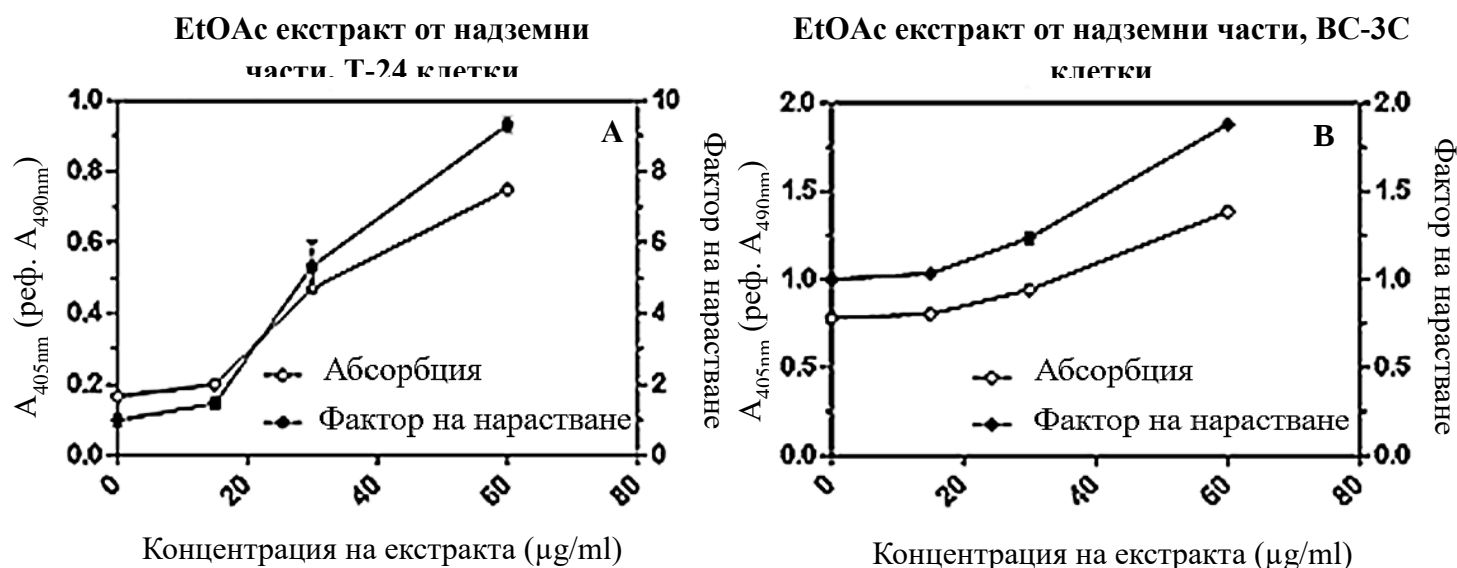


При този експеримент беше определен диапазона на експерименталните концентрации, а именно не по-високи от 60 $\mu\text{g/ml}$, за да се избегне токсичен ефект. EtOAc екстракт от надземни части повишава по концентрационно-зависим начин нивата на GSH в клетъчна линия HEP-G2 (Фигура 16A). В концентрации от 3.75 до 30 $\mu\text{g/mL}$ нивата на GSH в HEK-293 клетки се увеличават, докато при 60 $\mu\text{g/mL}$ се понижават и достигат тези на нетретираната контрола, което вероятно се дължи на овладяването на ендогенни оксидативни процеси в клетката (Фигура 16B). При клетъчна линия HEP-G2 се наблюдава увеличение на нивата на GSH до 60 $\mu\text{g/mL}$. Кумулацията на GSH вероятно също се дължи на овладяване на ендогенните оксидативни промени. Паралелно беше направена флуоресцентна микроскопия на същите проби след оцветяване по Хъохст върху двете клетъчни линии, при която се наблюдават единични апоптозни клетки (фрагментация на ДНК в ядрата).

6.9. Определяне на нивата на фрагментирана ДНК в цитозола

Индукцията на апоптоза в клетъчни линии T-24 и BC-3C беше доказана и с ELISA тест за количествено определяне на фрагментирана ДНК в цитозола на третираните третиране с EtOAc екстракт от надземни части на *G. urbanum* клетки (Фигура 17).

Фигура 17. Определяне нивата на фрагментирана ДНК в цитозола на T-24 (A) и BC-3C (B) клетки

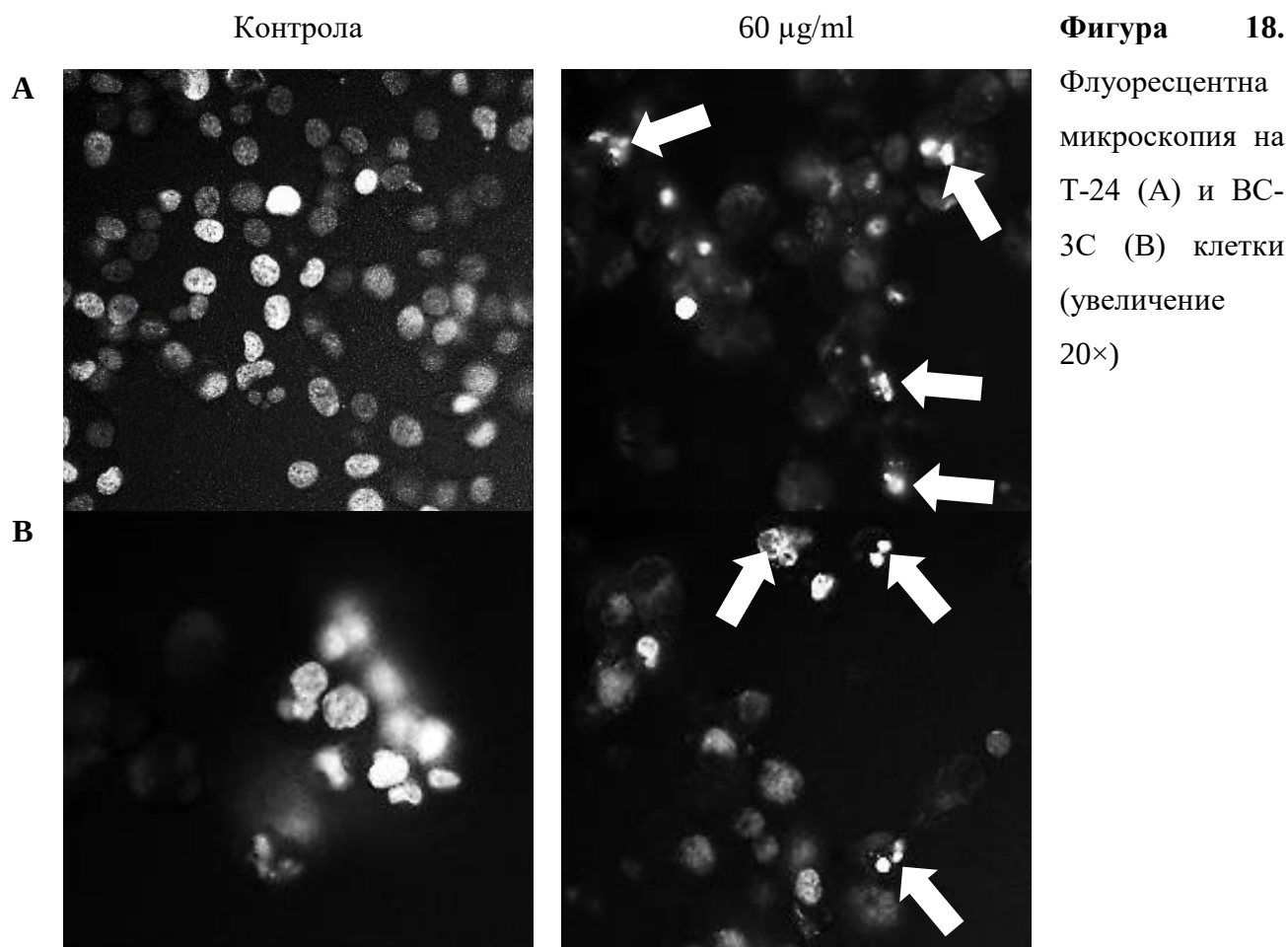


Индукцията на апоптоза в клетъчна линия T-24 беше доказана и с ELISA тест за количествено определяне на фрагментирана ДНК в цитозола на третираните клетки.

Както се вижда от данните, представени на Фигура 17А, фракцията на цитозолната фрагментирана ДНК нараства до 9 пъти спрямо нетретираната контрола след експозиция на клетките с 60 $\mu\text{g/ml}$ от екстракта. Нарастването на тази фракция е сигнификантно още при концентрация 30 $\mu\text{g/ml}$. Ефектът е концентрационно-зависим. Факторът на нарастване отразява количеството на фрагментираната ДНК в цитозола след нормализиране спрямо контролата, при което последната се приема за единица. Паралелната крива показва експерименталните данни от абсорбцията. При клетъчна линия ВС-3С нарастването на фрагментираната ДНК в клетъчния цитозол е по-слабо изразено, отколкото при Т-24, а именно – до 2 пъти над нетретираната контрол при 60 $\mu\text{g/ml}$. Тук също е налице концентрационно-зависимо нарастване на апоптозните клетки при концентрациите от 30 $\mu\text{g/ml}$ нагоре (Фигура 17В).

6.10. Флуоресцентна микроскопия

В допълнение бе доказано отключването на апоптоза в клетъчни линии Т-24 и ВС-3С на 48^{ия} h след третиране с EtOAc екстракт от надземни части в концентрации 15-60 $\mu\text{g/ml}$ чрез флуоресцентна микроскопия (Фигура 18).

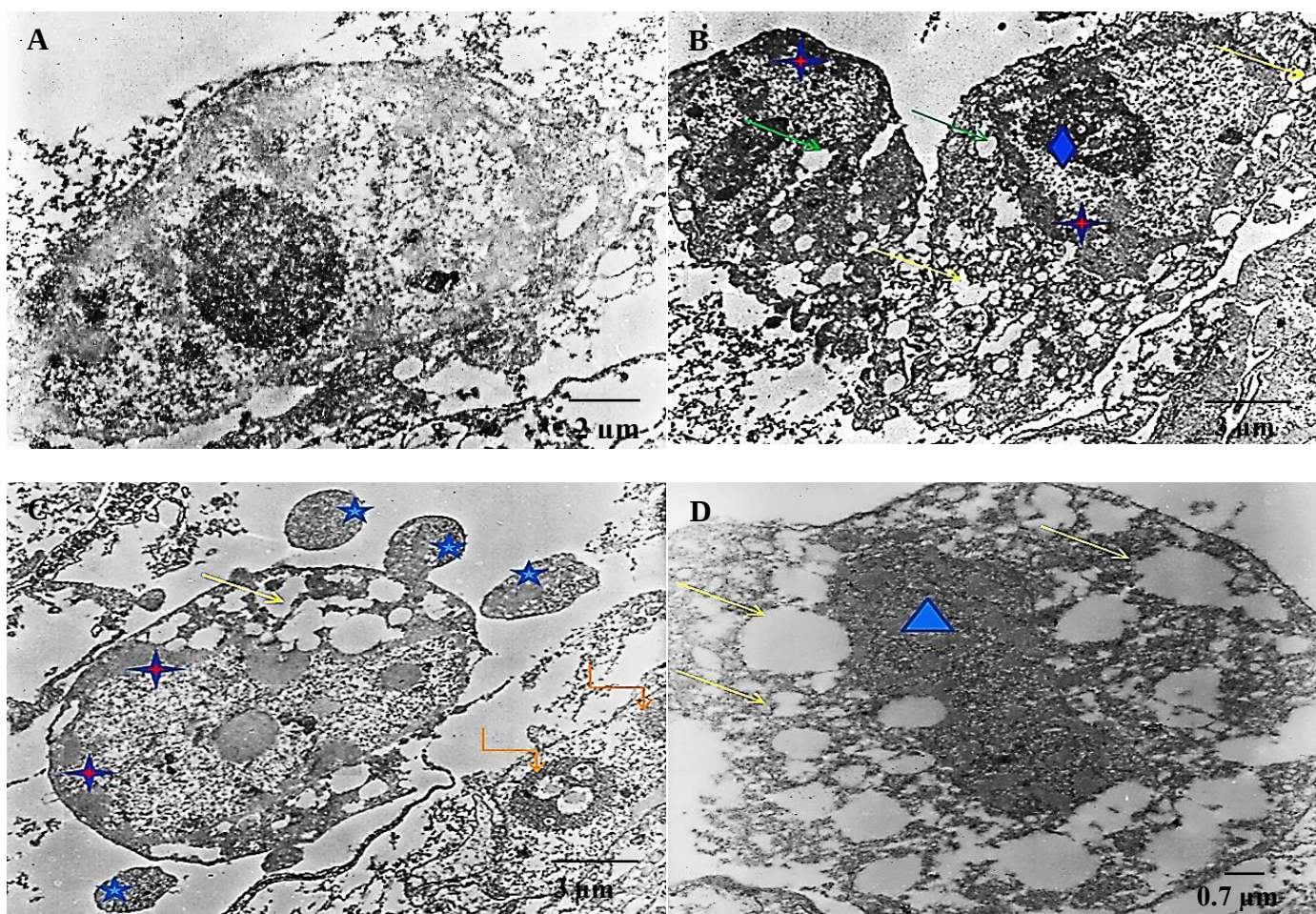


В туморната клетъчна линия T-24 EtOAc екстракт в концентрация 60 $\mu\text{g/ml}$ индуцира в най-силна степен ядрената фрагментация, за разлика от нетретираната контрола и другите две концентрации. Концентрационно-зависима индукция на апоптоза е характерна и за другата клетъчна линия BC-3C, като при нея обаче този процес е по-слабо изразен. При другите две концентрации (15 и 30 $\mu\text{g/ml}$) се наблюдават единични клетки с фрагментирани ядра. Фрагментацията на клетъчните ядра е морфологичен белег за отключване на програмирана клетъчна смърт. Фрагментираните ядра са показани на фигурата със стрелки.

6.11. Трансмисионна електронна микроскопия

Посредством трансмисионна електронна микроскопия беше анализиран цитотоксичния ефект върху T-24 клетки след 24 h инкубация с EtOAc екстракт от надземни части на изследваното растение в концентрация $32 \times \text{IC}_{50}$ (625 $\mu\text{g/ml}$).

Фигура 19. Цитотоксичност в T-24 клетки на 24^{ти} h след третиране с EtOAc екстракт от надземни части



Легенда: ★ кондензация и маргинация на хроматина

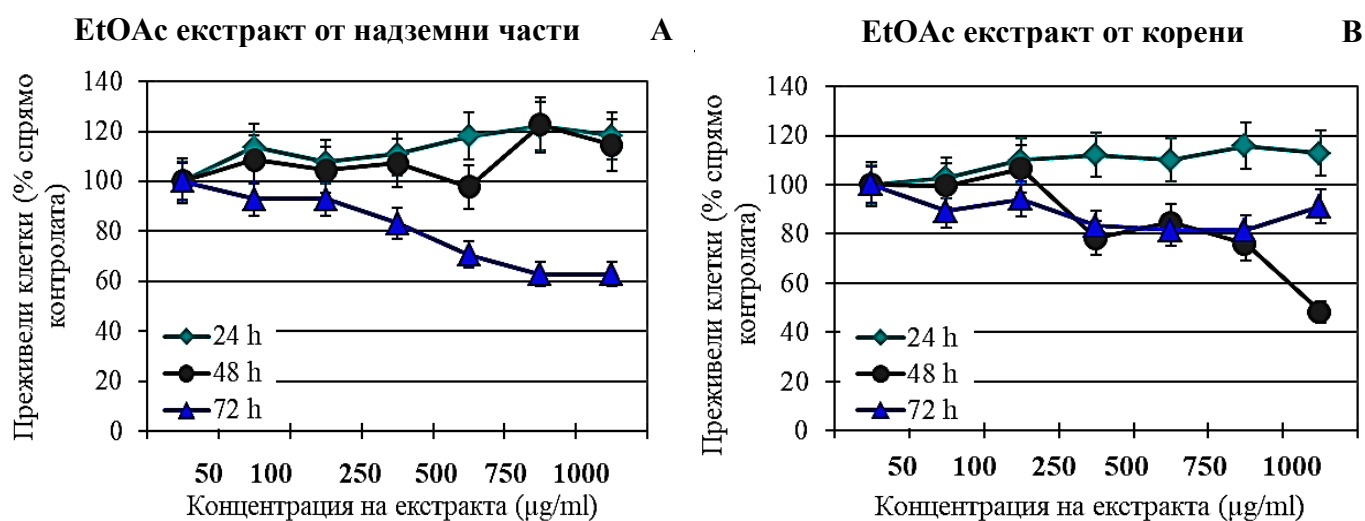
- ◆ нуклеола
(жълта стрелка) вакуолизация на митохондриите и др. клетъчни структури
- апоптотични телца в близост до клетка преминаваща апоптозен процес-маргинация на хроматин, силна вакуолизация на клетъчните органели
- (оранжева стрелка) сливане на лизозоми с фагозоми и образуване на автофагозоми
- ядрена пикноза

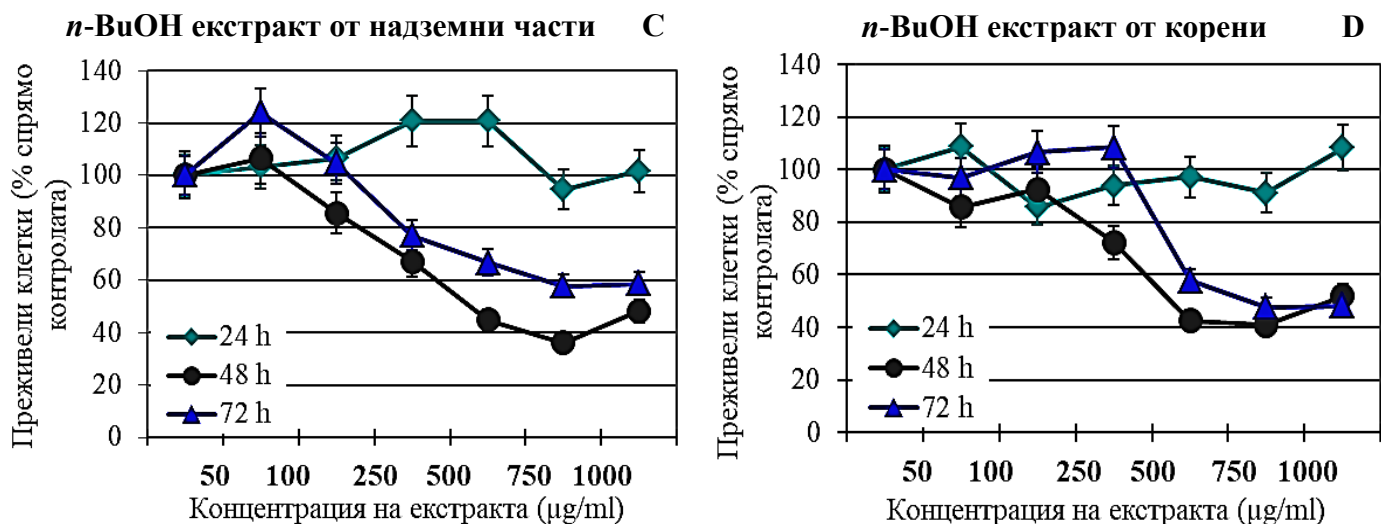
Тази концентрация беше използвана, тъй като проявява силен антибактериален ефект, а често ракът на пикочен мехур е съпроводен от бактериални инфекции.

6.12. Антинеопластичен ефект срещу клетъчна линия Raji

Лимфомът на Бъркит е силно агресивен тип неходжкинов В-клетъчен лимфом. Той е свързан с вируса на Епщайн-Бар (EBV), който допринася за около 1.5% от всички случаи на рак в световен мащаб (Farrell, 2019; Hu et al., 2017). EBV е херпесен вирус, отговорен за доживотна латентна инфекция, който засяга до 90% от човешката популация (Dunmire et al., 2018). Цитотоксичният ефект на EtOAc и *n*-BuOH екстракти беше определен *in vitro* и върху клетъчна линия Raji с произход лимфом на Бъркит. Резултатите са представени на Фигура 20.

Фигура 20. Антипролиферативен ефект на EtOAc екстракт от надземни части (А) и корени (В), както и на *n*-BuOH екстракти от надземни части (С) и корени (D) върху клетъчна линия Raji





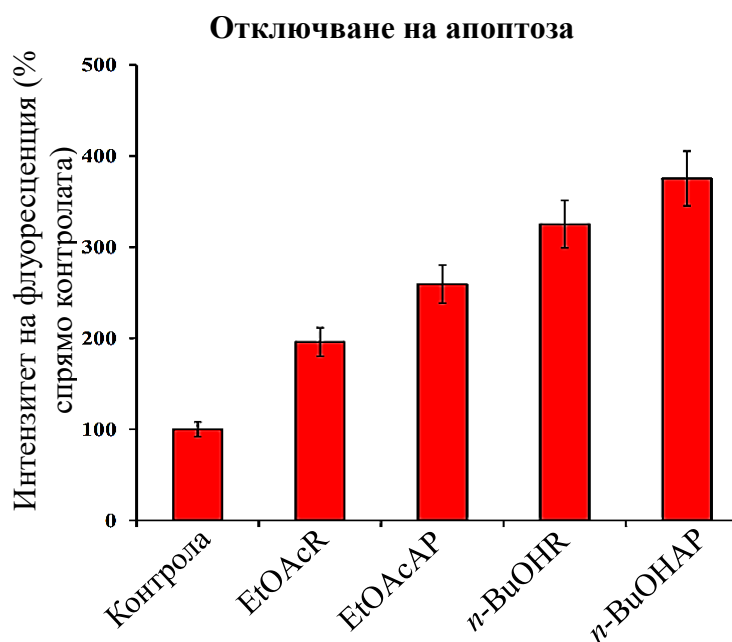
Четири тествани екстракта от *G. urbanum* потискат клетъчния растеж в зависимост от използваната доза и времето на въздействие. Антипролиферативният ефект на тестваните екстракти най-добре се проявява след третиране на 48^{ия} h. Изключение прави EtOAc екстракт от надземни части (Фигура 20A), който първоначално индуцира и на 72^{ия} h редуцира Raji-клетките с около 40%. EtOAc екстракт от корени повлиява силно на клетките (на 48^{ия} h) като редуцира тяхната жизнеспособност с около 50%, докато на 72^{ия} h виталността на клетките нараства с над 30% (Фигура 20B). *N*-BuOH фракции показват най-висока цитотоксичност (около 60%) в концентрация 750 µg/ml след 48 h инкубация (Фигура 20C и Фигура 20D). В сравнение с конвенционалните цитостатици, цитотоксичността на тези екстракти е около 3 пъти по-ниска. Например, стойностите на IC₅₀ за доксорубин, цисплатин и ломустин, изчислени за същите левкемични клетки и време на инкубиране (48 h) са съответно 275, 200 и 200 µg/kg. Трябва обаче да се отбележи, че конвенционалните химиотерапевтици се характеризират със силно изразени нежелани странични ефекти върху бързо пролифериращите нормални клетки и тъкани (Ivanova et al., 2013), докато нежеланите ефекти на природните агенти (като например екстракти от *G. urbanum*) са с по-ниска честота. Много растителни продукти повишават чувствителността на малигнено трансформирани клетки към конвенционалните медикаменти и техните комбинации проявяват синергична цитотоксичност или елиминират резистентността към много лекарства (Kojima-Yuasa et al., 2015; Molnar et al., 2010; Zhelev et al., 2016).

6.13. Тест за отключване на апоптоза в Raji клетки

Методът се основава, че скоро след започване на апоптоза, повечето видове клетки преместват мембранныя фосфолипид фосфатидилсерин (PSer) от вътрешната

страна на плазмената мембрана до клетъчната повърхност. Щом се появи на клетъчната повърхност, PSer може лесно да бъде открит чрез оцветяване с флуоресцентен конюгат на Анексин V, протеин, който има силен естествен афинитет към PSer.

Резултатите от отключването на апоптоза в клетъчна линия Raji след 48 h третиране с EtOAc и *n*-BuOH екстракти в концентрация 750 µg/ml са представени на Фигура 21.



Фигура 21. Отключване на апоптоза в клетъчна линия Raji

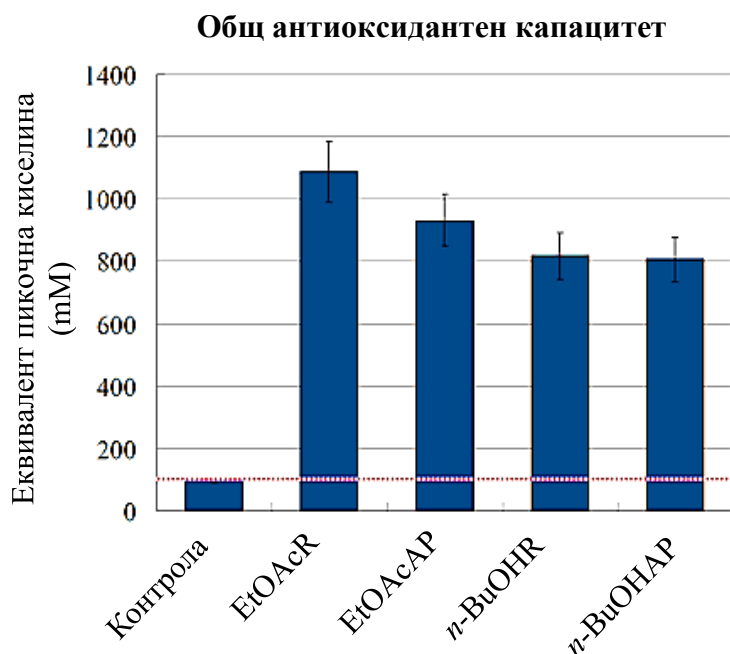
Четири тествани екстракти отключват апоптоза в клетъчна линия Raji. Най-силен ефект се наблюдава при *n*-BuOH екстракт от надземни части, който индуцира нивата на програмирана клетъчна смърт до 3 пъти повече, в сравнение с нетретирани клетки, последван от този на корени и EtOAc екстракти. Наблюдава се добра негативна зависимост между нивото на PSer върху клетъчната повърхност и клетъчната жизнеспособност ($R = -0.9825$; $p < 0.01$).

6.14. Определяне нивата на тотален антиоксидантен капацитет

В последните няколко години все повече експериментални данни дават основание да се предполага, че клетъчният редокс-статус би могъл да се използва и като маркер за прогнозиране на ефективността на противотуморните лекарствени препарати и изхода от противотуморната терапия. В литературата се откриват съобщения, че конвенционалните химиотерапевтици предизвикват генериране на високи количества АКФ, които индуцират оксидативен стрес и инициират апоптоза по АКФ-зависими сигнални пътища (Ivanova et al., 2013; Ivanova et al., 2016), но има и

такива от ново поколение, които индуцират апоптоза в раковите клетки по АКФ-независим механизъм.

Нивата на ТАК в клетъчна линия Raji бяха определени на вътреклетъчно ниво след 48 h инкубация с тестваните екстракти в концентрации 750 µg/ml (Фигура 22).

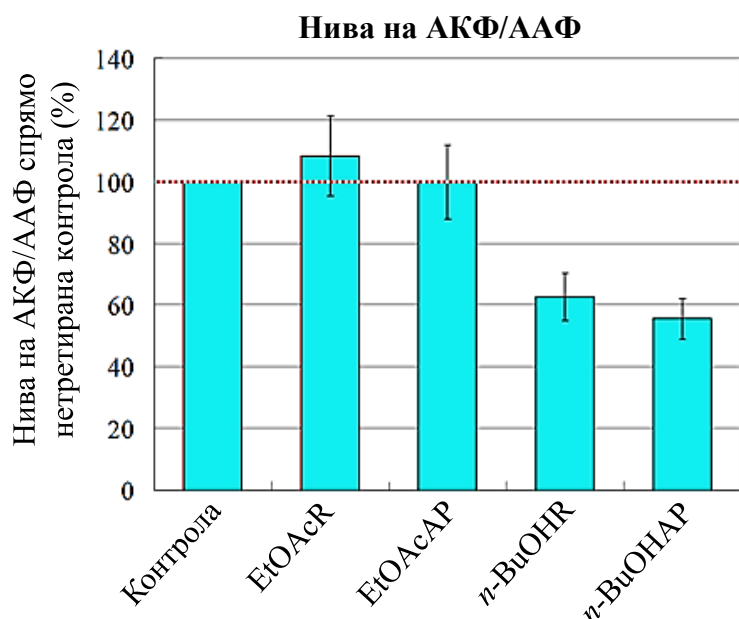


Фигура 22. Определяне нивата на ТАК в клетъчна линия Raji

Всички екстракти увеличават общия редукционен капацитет на лимфомните клетки на Бъркит. EtOAc фитокомплекси повишават до 5 пъти нивата на ТАК в изследваната клетъчна линия. Между стойностите на *n*-BuOH екстракти не се открива съществена разлика. Резултатите корелират добре с тези, получени от индуцирането на апоптоза (Фигура 21).

6.15. Определяне нивата на АКФ/ААФ

Методът се основава на използването на флуорогенната сонда 2',7'-дихлородихидрофлуоресцин DiOxyQ (DCFH - DiOxyQ), която в цитозола се деацетилира до нефлуоресцентен 2',7'-дихлородихидрофлуоресцин (DCFH). Последният реагира с АКФ и ААФ с образуване на флуоресцентен продукт - 2',7'-дихлородихидрофлуоресцеин (DCF). Интензитетът на DCF флуоресценцията е пропорционален на количеството на АКФ/ААФ в пробата (Фигура 23).

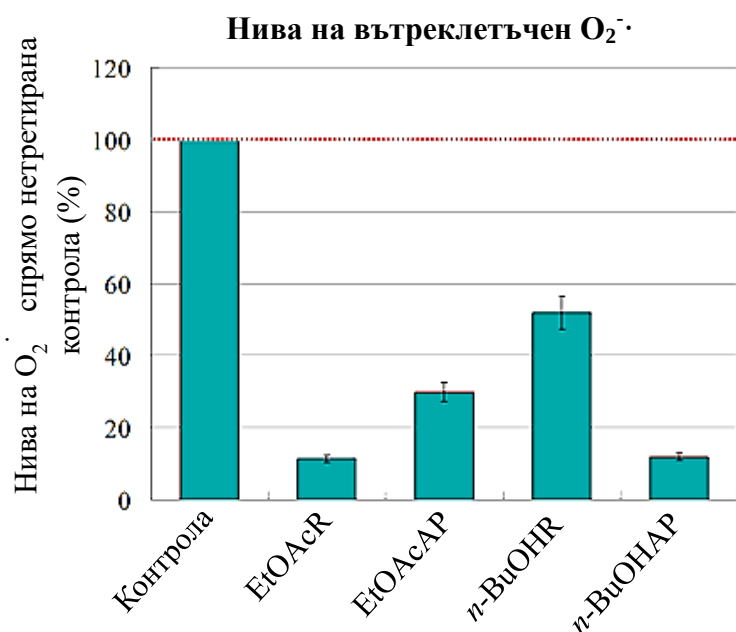


Фигура 23. Определяне нивата на АКФ/ААФ в клетъчна линия Raji

H_2O_2 се смята за "анти-онкогенен", а $\text{O}_2^{\cdot-}$ се счита за "онкогенен" АКФ (Pervaiz and Clement, 2007; Trachootham et al., 2009). От получените резултати се установи, че единствено EtOAc екстракт от корени индуцира абнормната клетъчна генерация на H_2O_2 , $\text{ROO}^{\cdot}$, NO , ONOO^- , анализирана чрез DCF теста, за разлика от *n*-BuOH екстракти, които оказват силно редокс-модулиращо действие. Не се установи корелация между DCF флуоресценцията в третираните клетки и тяхната виталност ($R = -0.3722$; $p > 0.05$). Предполага се, че това се дължи на неспецифичността на този аналитичен тест. DCF не може да разграничи "онко-подтискащите" H_2O_2 и ААФ, които играят двойна роля в клетъчната пролиферация и жизнеспособност (Vannini et al., 2015).

6.16. Определяне нивата на вътреклетъчния супероксиден анион

Нивата на $\text{O}_2^{\cdot-}$ бяха анализирани с дихидроетидиум (DHE), който представлява клетъчно проникваща флуорогенна сонда, взаимодействаща предимно със $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Фигура 24). Той позволява разграничаване между $\text{O}_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 .



Фигура 24. Определяне нивата на вътреклетъчния $O_2^{\cdot-}$ в клетъчна линия Raji

Изследваните екстракти не повишават нивата на вътреклетъчния $O_2^{\cdot-}$, а ги редуцират. EtOAc екстракт от корени и *n*-BuOH екстракт от надземни части намаляват нивата на генериран $O_2^{\cdot-}$ в най-голяма степен (с около 90%). Наблюдава се зависимост между флуоресценцията на DHE в третираните клетки и тяхната жизнеспособност, която се редуцира с намаляването на $O_2^{\cdot-}$ ($R = 0.9843$; $p < 0.01$). Намаляването на "онкогенния" $O_2^{\cdot-}$ е една от стратегиите за унищожаване на раковите клетки.

ИЗВОДИ

1. Установено е, че от всички получени дванадесет екстракта с най-високо съдържание на фенолни съединения се характеризират EtOAc от корени (61.2%) и надземни части (32.1%), последвани от MeOH (19.9%, респективно 11.3%) и *n*-BuOH (16.1%, респективно 13.4%) фракции. EtOAc и *n*-BuOH екстракти от надземни и подземни части са най-богати на танини. EtOAc и MeOH екстракти от корени са богати на терпеноиди и флавоноиди.
2. EtOAc от корени демонстрира силна антиоксидантна активност, последван от този на надземни части.
3. Изолирани и идентифицирани са осем индивидуални съединения от EtOAc екстракт на корени: процианидин В3 **(1)**, катехин **(2)**, геин **(3)**, нига-ичигозида F1 **(4)**, торментиковата киселина **(5)**, 3,3'-ди-*O*-метилелагова киселина-4-*O*- β -*D*-глюкопиранозида **(6)**, 3-*O*-метилелагова киселина-3'-*O*- α -3''-*O*-ацетилрамнопиранозид **(7)** и 3-*O*-метилелагова киселина-3'-*O*- α -2''-*O*-ацетилрамнопиранозид **(8)**. Изолиран и идентифициран е β -ситостерол **(9)** от петрол етерния екстракт на корени на *G. urbanum*.
4. Определена е антимикробната активност на всички екстракти. EtOAc екстракт от надземни части на *G. urbanum* L. прояви най-ниски стойности на МИК срещу MRSA и *S. epidermidis*, както и бактерициден ефект срещу *B. cereus*. В комбинация с пеницилин този екстракт намалява двукратно индивидуалната изискуема доза на антибиотика срещу пеницилин-резистентен щам от вид *S. aureus*. От тестваните съединения, единствено торментиковата киселина показва микробостатичен ефект срещу *S. aureus* и *C. albicans*, докато катехина прояви бактерицидност срещу *S. aureus* и *P. aeruginosa*.
5. Установено е, че EtOAc и *n*-BuOH екстракти от корени и надземни части на изследваното растение инхибират синтеза на процианин и подвижността на *P. aeruginosa* PA01, докато EtOAc екстракт от надземни части потиска образуването на стафилококови биофилми.
6. Установено е, че *N*-BuOH екстракти проявяват силен противовирусен ефект срещу *Herpes simplex* тип 1, последвани от MeOH. EtOAc екстракти са активни срещу човешкия аденовирус 5.

7. Определен е силния цитотоксичен ефект на EtOAc екстракт от надземни части върху туморните клетъчни линии Т-24 и ВС-3С, в сравнение с нормалните клетки, като отключва ранна и напреднала фаза на апоптоза в тях.

8. Открито е, че *n*-BuOH екстракти от корени и надземни части на *G. urbanum* проявяват по-силен антилимфомен ефект върху клетъчна линия Raji, в сравнение с EtOAc екстракти, като и четирите екстракта отключват апоптоза в клетките на 48^{ия} h в концентрация 750 µg/ml. EtOAc екстракт от корени повишава до 5 пъти повече нивата на ТАС, спрямо нетретираните клетки. *N*-BuOH екстракт от надземни части проявява най-силно редокс-модулиращо действие върху ендогенните нива на H₂O₂, ROO·, NO, ONOO⁻. Същият екстракт, както и EtOAc от корени, потискат до 90% нивата на вътреклетъчния O₂⁻.

ПРИНОСИ КЪМ ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

1. За първи път са изолирани и идентифицирани 3-О-метилелагова киселина-3'-О-α-3''-О-ацетилрамнопиранозид и 3-О-метилелагова киселина-3'-О-α-2''-О-ацетилрамнопиранозид от род *Geum*, както и 3,3'-ди-О-метилелагова киселина-4-О-β-D-глюкопиранозид, торментикова киселина и нига-ичигозид F1 от вид *G. urbanum*.

2. Доказан е инхибиторния ефект на EtOAc и *n*-BuOH екстракти от корени и надземни части на *G. urbanum* срещу RhI системата на *P. aeruginosa* PA01. EtOAc екстракт от надземни части потиска Agr системата на щамове от вид *S. aureus*.

3. Доказана е *in vitro* по-ниската цитотоксичност срещу нетуморогенни клетъчни линии и високата антинеопластична активност на EtOAc екстракт от надземни части върху карцином на пикочен мехур. EtOAc и *n*-BuOH екстракти от корени и надземни части на *G. urbanum* L. модулират редукционния капацитет, потискат "онкогенния" супероксид и индуцират апоптоза в лимфомни клетки.

4. Установено е, че EtOAc и *n*-BuOH са най-подходящи органични разтворители за концентриране на биологично активни съединения, действащи в синергизъм, от MeOH екстракти на *G. urbanum* L.

ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Dimitrova, L.**, Zaharieva, M. M., Popova, M., Kostadinova, N., Tsvetkova, I., Bankova, V., Najdenski, H., **2017**. Antimicrobial and antioxidant potential of different solvent extracts of the medicinal plant *Geum urbanum* L. Chemistry Central Journal 11(1), 113. IF: 2.442
2. **Dimitrova, L.**, Popova, M., Bankova, V., Najdenski, H., **2019**. Anti-quorum sensing potential of *Geum urbanum* L. Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences 72(3), 341-349. IF: 0.27

ОТКРИТИ ЦИТАТИ В ДОСТЪПНАТА ЛИТЕРАТУРА

Dimitrova, L., Zaharieva, M. M., Popova, M., Kostadinova, N., Tsvetkova, I., Bankova, V., Najdenski, H., 2017. Antimicrobial and antioxidant potential of different solvent extracts of the medicinal plant *Geum urbanum* L. Chemistry Central Journal 11(1), 113. IF: 2.442

1. Sadiki, F. Z., El Idrissi, M., Sbiti, M., Lemrhari, A., Trifan, A., Cioanca, O., Postu, P. A., Hritcu, L. (2018). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters branches of eastern Morocco. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 5(1), 24.

ДОКЛАДВАНЕ ПРЕД НАУЧНИ ФОРУМИ НА НАУЧНИТЕ РЕЗУЛТАТИ

Участие с 4 доклада в 4 конференции:

Dimitrova L., Zaharieva M.M., Popova M., Tsvetkova I., Konstantinov S.M., Bankova V., Najdenski H. Antimicrobial and cytotoxic potential of extracts and compounds derived from the plant *Geum urbanum* L. International Scientific Conference “Microbiology for a better health and industry”, Sofia, 14-15.03.2017

Dimitrova L., Zaharieva M.M., Kostadinova N., Popova M., Tsvetkova I., Konstantinov S.M., Bankova V., Najdenski H. Investigation of extracts derived from the plant *Geum urbanum* L. as drug candidates with antimicrobial and cytotoxic activity. 5th International Conference on "Environmental Engineering and Environmental Protection", Plovdiv, 5-7.06.2017

Dimitrova L., Zaharieva M.M., Kostadinova N., Popova M., Tsvetkova I., Konstantinov S.M., Bankova V., Najdenski H. Investigation of Extracts Derived from the Plant *Geum urbanum* L. as Drug Candidates with Antimicrobial and Cytotoxic Activity. Biomedicine and Quality of Life, Sofia, 26-27.06.2017

Dimitrova L., Zaharieva M.M., Kostadinova N., Popova M., Tsvetkova I., Konstantinov S.M., Bankova V., Najdenski H. Biological activity of extracts isolated from *Geum urbanum* L. 14th Congress of Microbiologists in Bulgaria with International Participation, Hisarya, 10-13.10.2018

Участие с 13 постера в 12 конференции:

Dimitrova L., Popova M., Tsvetkova I., Bankova V., Najdenski H. Antimicrobial activity of extracts from genus *Geum*. 13th Congress of microbiologists with international participation, Tryavna, 7-10.10.2014

Dimitrova L., Popova M., Tsvetkova I., Bankova V., Najdenski H. Chemical composition and antibacterial activity of *Geum urbanum* extracts. 2nd National Food Conference with International Participation, Sofia, 22-24.03.2015

Dimitrova L., Popova M., Tsvetkova I., Bankova V., Najdenski H. Chemical composition and antibacterial activity of *Geum urbanum* extracts. Beneficial and pathogenic microbes for healthier life and safety foods, Sofia, 8-9.04.2015

Dimitrova L., Popova M., Tsvetkova I., Bankova V., Najdenski H. Antibacterial activity of *Geum urbanum* extracts. 4th National Conference with International Participation and Youth Scientific Session "Environmental Engineering and Environmental Protection", Burgas, 3-6.06.2015

Dimitrova L., Popova M., Tsvetkova I., Bankova V., Najdenski H. Antibacterial activity of *Geum urbanum*. Antibacterial activity of *Geum urbanum* extracts. 9th Microbiologia Balkanica, Thessaloniki, Greece, 22-24.10.2015

Dimitrova L., Popova M., Zaharieva M.M., Tsvetkova I., Konstantinov S.M., Bankova V., Najdenski H. Activity of *Geum urbanum* L. extracts against selected food-borne pathogens. Symposium on Food Pathogens and Food Safety, Sofia, 26-27.05.2016

Dimitrova L., Zaharieva M.M., Popova M., Tsvetkova I., Konstantinov S.M., Bankova V., Najdenski H. Investigation of extracts and compounds derived from the plant *Geum urbanum* L. for antimicrobial and cytotoxic potential. 6th Congress of Pharmacy with International Participation, Sandanski, 13-16.10.2016

Dimitrova L., Zaharieva M.M., Popova M., Tsvetkova I., Konstantinov S.M., Bankova V., Najdenski H. Investigation of extracts derived from the plant *Geum urbanum* L. for antimicrobial and cytotoxic potential. 3rd International Food Conference "The Challenges for Quality and Safety along the Food Chain", Sofia, 23-25.03.2017

Dimitrova L., Zaharieva M.M., Kostadinova N., Popova M., Tsvetkova I., Konstantinov S.M., Bankova V., Najdenski H. Investigation of extracts derived from the plant *Geum urbanum* L. as drug candidates with antimicrobial and cytotoxic activity. 3rd International Conference on Natural Products Utilization: from Plant to Pharmacy Shelf, Bansko, 18-21.10.2017

Mileva M., **Dimitrova L.**, Bankova V., Najdenski H., Bakalova R., Aoki I. Effect of ethyl acetate and butanol extracts of *Geum urbanum* L. on cell cytotoxicity and cell proliferation of Burkitt's lymphoma cells. 3rd International Conference on Natural Products Utilization: from Plant to Pharmacy Shelf, Bansko, 18-21.10.2017

Zaharieva M.M., Popova M., Paunova-Krasteva Ts., Tsvetkova I., Stoitsova S., Konstantinov S.M., Bankova V., Najdenski H., **Dimitrova L.** Antimicrobial and antineoplastic activity of fractions derived from *Geum urbanum* L. 4th European Biopharma Congress & 6th International

Conference and Exhibition on Pharmacology and Ethnopharmacology, Vienna, Austria, 09-11.11.2017

Dimitrova L., Zaharieva M.M., Popova M., Tsvetkova I., Konstantinov S.M., Bankova V., Najdenski H. Evaluation of the antimicrobial, cytotoxic and radical scavenging potential of different solvent extracts of the medicinal plant *Geum urbanum* L. 10th Balkan Congress of Microbiology, Microbiologia Balkanica 1017, Sofia, 16-18.11.2017

Dimitrova L., Philipov S., Zaharieva M.M., Miteva-Staleva J., Popova M., Tserovska L., Krumova E., Zhelezova G., Konstantinov S.M., Bankova V., Najdenski H. Anti-staphylococcal effect and *in vivo* toxicity of ethyl acetate fraction from aerial parts of *Geum urbanum* L. 14th Congress of Microbiologists in Bulgaria with International Participation, Hisarya, 10-13.10.2018

ПОЛУЧЕНИ НАГРАДИ ПО ТЕМАТА

1. Награда от Четвърта национална конференция с международно участие и младежка научна сесия „Екологично инженерство и опазване на околната среда“ за най-добър постер на млад учен, гр. Бургас, 03-06.06.2015 г.;
2. Награда от Пета международна конференция „Екологично инженерство и опазване на околната среда“ за отлични научни изследвания на млад учен, гр. Пловдив, 05-07.06.2017 г.;
3. Награда за най-добра работа на млад микробиолог през 2017 г. на Фондация „Акад. проф. д-р Стефан Ангелов“ за „Антимикробен и антиоксидантен потенциал на различни разтворими екстракти от медицинското растение *Geum urbanum* L.“, гр. София, 14 март 2018 г.
4. Спечелен е грант за участие в 14th Congress of Microbiologists in Bulgaria with International Participation, Hisarya, 10-13.10.2018.