



**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ
„СТЕФАН АНГЕЛОВ“**

инж. Савета Георгиева Младенова

**Изследване на анти-обезогенен потенциал на
екстракти от *Alchemilla monticola* Opiz и
Ononis spinosa L. за контрол на затлъстяване
в *ин витро* и *ин vivo* модели**

АВТОРЕФЕРАТ

**На дисертационен труд
за присъждане на образователната и научната
степен „доктор“ по направление 5.11. Биотехнологии
(Технология на биологично активните вещества)**

Научен ръководител: проф. д-р Милен И. Георгиев

Пловдив, 2026

Дисертационният труд е написан на 108 страници. Той е онагледен с 24 фигури и 7 таблици. Цитирани са 223 литературни източника.

Дисертационният труд е одобрен и насрочен за защита от национален научен семинар по „Приложна микробиология и микробни биотехнологии“ при Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН, чието заседание се състоя на 19.06.2026 година.

Докторантът е отчислен с право на защита със Заповед № I-81/28.05.2026 година на директора на ИМикБ – БАН, проф. д-р Пенка Петрова, дн.

Членове на научното жури:

Проф. д-р Светла Трифонова Данова

Доц. д-р Петя Асенова Димитрова

Проф. д-р Велизар Костадинов Гочев

Проф. д-р Магдалена Спасова Кондева-Бурдина

Проф. д-р Теодора Светославова Ханджиева-Дърленска

Защитата на дисертационния труд ще се състои на от часа в семинарната зала на Института по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН (ИМикБ), гр. София.

Материалите по защитата са на разположение в ИМикБ – БАН и са публикувани на интернет страницата на ИМикБ – БАН.

Съдържание:

Използвани съкращения	2
I. ВЪВЕДЕНИЕ	3
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	6
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	7
IV. РЕЗУЛТАТИ	12
1. Метаболитно профилиране на експерименталните екстракти	12
2. <i>In silico</i> докинг симулация	18
3. Оценка на анти-адипогенния потенциал на екстракт от <i>A. monticola</i> и неговите активни вещества при <i>ин витро</i> модел на човешки адипоцити	22
4. Анти-адипогенен ефект при <i>ин витро</i> модел на човешки адипоцити третиран с екстракт от <i>O. spinosa</i> и негови вторични метаболити	26
5. Валидиране на установената <i>ин витро</i> анти-адипогенна активност на маакияин при <i>ин vivo</i> модел на затлъстяване при нематоди от вида <i>C. elegans</i>	32
V. ДИСКУСИЯ	38
VI. ИЗВОДИ	50
VII. ПРИНОСИ	51
Благодарности	52
Публикувани материали по дисертацията	53

Използвани съкращения

ACC	Ацетил-КоА карбоксилаза
ADIPOQ	Адипонектин
AKT	Протеин киназа В
ALM	Екстракт от надземни части от цариче (<i>A. monticola</i>)
AMPK	Аденозин монофосфат-активирана протеин киназа
AST	Астрагалин
ATP	Аденозин трифосфат
CEBP	ССААТ/енхансер-свързващ протеин
CTCF	Corrected total cell fluorescence
DMSO	Диметилсулфоксид
DNA	Дезоксирибонуклеинова киселина
ER	Естрогенен рецептор
FASN	Синтаза на мастни киселини
GAPDH	Глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа
IGF	Инсулиноподобен растежен фактор
INSR	Инсулинов рецептор
IRS	Инсулин-рецепторен субстрат
MACK	Маакияин
MSCs	Мезенхимни стволови клетки
MTT	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолиев бромид
ONON	Ононин
OSR	Екстракт от корени на гръмотрън (<i>O. spinosa</i>)
ORST	Орлистат
PI3K	Фосфоинозитид 3-киназа
PPAR	Пероксизомен пролифератор-активиран рецептор
QUE	Кверцитрин
RNA	Рибонуклеинова киселина
RPL13A	Рибозомен протеин L13a
RT-qPCR	Количествена полимеразна верижна реакция в реално време
SERBP	Стерол-регулаторен елемент-свързващ протеин
SGBS	Синдром на Simpson-Golabi-Behmel
SIRT	Сиртуин
TUBB	Тубулин
WB	Имуноблот
ЯМР	Ядрено-магнитно-резонансна спектроскопия

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Използването на лечебни растения има вековна история, включително за контрол на теглото, главно на базата на емпирични етнофармакологични знания (Vasileva et al., 2018; Anyanwu et al., 2025). Многокомпонентният състав на растителните екстракти и комплексната структура на съдържащите се вторични метаболити допринасят за синергичния ефект при лечението на затлъстяването (Atanasov et al., 2021; Vasileva et al., 2020a). Дешифрирането на механизма на действие на лечебните растения със съвременните подходи като метаболомика, транскриптомика и протеомика може да ускори откриването на нови биологично активни вещества, ефективни против затлъстяване (Park et al., 2016; Georgiev et al., 2020; Zaghlool et al., 2021). Най-важното предимство на природните продукти е, че действието им се проявява чрез повлияване на повече от един молекулярни механизми.

През последните години е налице тенденция на нарастване разпространението на затлъстяването и свързаните с него заболявания. По изчисления на Световната здравна организация (СЗО) в световен мащаб има повече от 650 милиона души със затлъстяване, съответно с индекс на телесната маса (ИТМ) над 30 кг/м² (Kivimäki et al., 2022). Прогнозите за глобалните нива на висок ИТМ показват, че близо 3.3 милиарда възрастни може да бъдат засегнати до 2035 г., в сравнение с 2.2 милиарда през 2020 г. Това отразява увеличение с над 54% до 2035 г. За младите хора на възраст от 5 до 19 години цифрата се увеличава от 22% с висок ИТМ (430 милиона) до над 39% (770 милиона) през следващото десетилетие (World obesity federation, 2024).

Прекомерното натрупване на мазнини при затлъстяване има многофакторна етиология, но основна роля играе енергийния дисбаланс в организма. Като резултат от него, излишните калории се отлагат под формата на триглицериди в мастната тъкан. Освен енергийния дисбаланс, нарушеното функциониране на централната нервна система, отговорна за финната регулация на потреблението на енергия чрез невронни и хуморални механизми, както и хомеостазата на мастната тъкан, допринасят за развитието на затлъстяването и свързаните с него заболявания.

Затлъстяването оказва значимо влияние върху качеството на живот и при клинично здрави индивиди. Независимо от обществените здравни политики и индивидуалните усилия в борбата с него, над 2 милиарда души по света са засегнати от този здравословен проблем. Очевидно, дефинирането на генетичните фактори, както и проучването на метаболитните пътища, базирано на „omics“ технологиите, може да играе много важна

роля като прецизно-ефективен подход в борбата със затлъстяването (Morton et al., 2006; González-Muniesa et al., 2017; Kiseleva et al., 2024).

Повишеното тегло обикновено се характеризира с по-висок риск от развитие на хронични заболявания като диабет тип 2, хипертония, атеросклероза, дислипидемия, неалкохолен стеатохепатит, репродуктивни проблеми, имунни нарушения, хронично нискостепенно възпаление и някои видове онкологични заболявания (Vasileva et al., 2018; Arner et al., 2019; Bluher, 2019; Wang et al., 2024). Към етиологичните фактори отговорни за развитие на затлъстяване спадат: енергиен дисбаланс, генетичната предразположеност, невроендокринните нарушения, факторите на околната среда и начина на живот, както и някои лекарствени терапии (Carayol et al., 2017; Bluher, 2019; Fathzadeh et al., 2020). Освен основното енергийно депо за мазнини, мастната тъкан е ендокринно-активен орган, който определя метаболитния баланс на целия организъм. Структурно се състои от зрели мастни клетки (адипоцити), техните предшественици – преадипоцити, стволови клетки, ендотелни клетки и различни имунни клетки (Arner et al., 2019; Ramirez et al., 2020). При затлъстели индивиди, разрастването на мастната тъкан се дължи на увеличен размер (хипертрофия) и/или брой (хиперплазия) на мастните клетки, което способства за повишената инфилтрация от имунни клетки и развитие на нискостепенно хронично възпаление и фиброза (Horwitz and Birk 2023). Промени в мастната тъкани при затлъстяване водят до различни видове стрес – оксидативен, метаболитен и механичен, които нарушават вътре- и междуклетъчната комуникация (Ramirez et al., 2020, Vasileva et al., 2020a; Wang et al., 2021; Zaghlool et al., 2021). Модулирането на процеса на адипогенна диференциация е сред най-използваните експериментални подходи за контрол на затлъстяването (Aprile et al., 2018; Mandl et al., 2019; Vasileva et al., 2021). Адипогенната диференциация е строго регулирана от взаимодействието между множество транскрипционни фактори. Пътят на фосфоинозитид 3-киназата (PI3K)/ протеин киназа В (АКТ) медира клетъчни сигнали за растеж, като този на инсулина през инсулиновия рецептор (INSR) на адипоцитите и така повлиява инициирането на диференциация (Min et al., 2013; Ortega-Molina et al., 2015; Huang et al., 2018; Li et al., 2025). В следващия етап тези сигнали се обработват от ключови участници като ССАТ/енхансер-свързващ протеин (C/EBPs), пероксизомен пролифератор-активирани рецептори (PPARs) и стерол регулаторен елемент-свързващ протеин (SERBP). Съвместно с регулираните от тях ензими, отговорни за липидния биосинтез като синтаза на мастни киселини (FASN) и ацетил-КоА карбоксилаза (ACC)

способстват за трансформирането на прекурсорната мастна клетка в зрял адипоцит (Vasileva et al., 2018; Mandl et al., 2019; Wang et al., 2021).

Подходите за контрол на затлъстяването включват ограничение на калорийния прием, подбор на нутриенти, в това число употребата на пробиотици и пребиотици, редовни физически упражнения и лекарствени средства (орлистат, лираглутид, семаглутид, тирзепатид, лоркасерин, фентермин в комбинация с топирамат), както и хирургични интервенции (Ruban et al., 2019; Sannidhi et al., 2025).

Напредъкът в научните изследвания, за повлияване на затлъстяването, извежда на преден план нуждата от многокомпонентен, индивидуален и продължителен лечебен подход при терапията на това многофакторно заболяване, включващ и психологическа оценка, която може да подпомогне за понижаването на тревожната тенденция (Baker et al., 2022). Освен това, особено значение имат молекулярните пътищата на действие на природните вещества с потенциал да модулират процеса на затлъстяване. Тези съединения проявяват ефекта си чрез следните механизми: потискане на апетита, инхибиране на липидната абсорбция, промяна във функцията на адипоцитите, повлияване β -клетките на панкреаса и чувствителността към инсулина, благоприятно въздействие върху чревната микробиота и свързаното със затлъстяването хронично възпаление (Min et al., 2013; Vasileva et al., 2018; 2020b; 2021; Li et al., 2020a; Benbaibèche et al., 2025).

Настоящият дисертационен труд, се основава на задълбочено проучване на ефекта на растителни екстракти от етнофармакологично-прилагани лечебни растения и техни специализирани метаболити върху молекулярните механизми, участващи в процесите на липо- и адипогенеза при човешки мастни клетки. Тези изследвания са надградени с експерименти с моделен организъм – *Caenorhabditis elegans*. Използваната организмова моделна система е посочена като целесъобразен подход за проследяване ефекта на биологично активни вещества върху липидната обмяна и свързаните с нея заболявания.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

1. Цел

Настоящия дисертационен труд има за цел да изследва влиянието на екстракти от цариче (*A. monticola*) и гръмотрън (*O. spinosa*) и техни вторични метаболити върху адипогенезата и натрупването на липиди при *ин витро* модел на човешки адипоцити и последващо *ин vivo* валидиране на най-значимите резултати при нематоди от вида *C. elegans*.

2. Задачи

Дефинирани са следните научни задачи за постигане на основната цел на настоящия дисертационен труд:

- 2.1. Литературна справка за традиционната употреба на лечебни растения при метаболитни нарушения.
- 2.2. Фитохимично охарактеризиране чрез ЯМР-базирано метаболитно профилиране на екстракти от избраните лечебни растения.
- 2.3. Компютърна *in silico* симулация на потенциалните взаимодействия между избрани чисти вещества от екстрактите и целеви адипогенни протеинови структури.
- 2.4. Изследване на анти-адипогенния потенциал на избраните екстракти и чисти вещества при модел на затлъстяване на човешки адипоцити.
- 2.5. Определяне на молекулярния механизъм на действие на екстрактите от цариче и гръмотрън и техните биологично-активните вещества при *ин витро* модел на човешки адипоцити.
- 2.6. Валидиране на анти-обезогенния потенциал на маакияин при *ин vivo* модел на затлъстяване при *C. elegans*.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Растителен материал и екстракция

Събраният растителен материал е подложен на лиофилизация на апарат VirTis BenchTop Pro с контролер Omnitronics™ от Genevac Ltd. (Ipswich, United Kingdom) и последваща екстракция в 50% метанол (1:30 w/v) с ултразвук в продължение на 20 минути при стайна температура. Екстрактът се филтрува, концентрира се под вакуум при 40 °C, лиофилизира се и се съхранява при -20 °C до момента на анализ.

2. Метаболитно профилиране посредством ядрено-магнитен резонанс (ЯМР)

Протоколът за екстракция, снемане на спектрите и последващ анализ е подробно описан от Georgiev et al. (2015). На кратко, спектралните данни от протонния (¹H) и 2D ЯМР анализите са снети при 25 °C на спектрометър Bruker AVII + 600 (Karlsruhe, Germany), работещ на честота 600.13 MHz с време за релаксация 4.07 s. Обратката и анализа на спектралните данни е извършен чрез специализиран софтуер MestreNova (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spain).

3. Молекулен докинг анализ

Докинг изчисленията са проведени чрез софтуер Autodock Vina на PyRx 0.8. Кристалните структури на целевите протеини са получени от Протеинова База Данни (PDB, www.wwpdb.org) с PDB ID, както следва: 1NWQ за C/EBPα; 2P4Y за PPARγ, 1O6L за АКТ, 5ITD за PI3K. За да се подготвят протеините за симулация на докинг, всички водни молекули и съкристализираните хетеромолекули са отстранени, с последващо добавяне на водородни атоми и неутрализация с помощта на обединени атомни заряди на Колман.

4. Клетъчна култура и третиране

Човешки SGBS преадипоцити са поддържани и диференцирани в съответствие с оптималните условия (Vasileva et al., 2020b; Wabitsch et al., 2001). Успоредно с индуцирането на адипогенната диференциация (ден 0) клетките са третирани, и при обновяването на хранителната среда съответно на ден 4^{ти} и 8^{ми}. Всички използвани концентрации са избрани след оценка на жизнеспособността на клетките чрез МТТ анализ. Екстрактите от надземни части от *A. monticola* (ALM) и корени от *O. spinosa* (OSR) са добавени към хранителната среда при крайни концентрации от 5, 10 и 25 µg/mL, докато чистите вещества AST, QUE, ONON са приложени в концентрации от 5, 10 и

25 μM , а за МАСК в концентрации 5, 10, 25 и 50 μM . Контролната група е третирана с 0.2% DMSO като носител (Vehicle). Всички анализи са проведени 24 часа след последното третиране съответно на 9-ия ден от диференциацията в поне три независими биологични експеримента.

5. Анализ за вътреклетъчно натрупване на липиди и отделяне на свободен глицерол

След фиксиране с формалин, диференцирани SGBS адипоцити са оцветени с разтвор на ORO, както е описано по-рано (Vasileva et al., 2020b). Количествено определяне на натрупаните липиди е извършено чрез измерване на абсорбцията на ORO багрилото при 495 nm на Anthos Zenyth 340 спектрофотометър от Biochrom Ltd., (Cambridge, United Kingdom) екстрахирано от адипоцитите след оцветяване.

Съдържанието на свободен глицерол в хранителната среда, е измерено с кит за анализ на адиполиза (кат. номер MAK313) от Merck KGaA, съгласно инструкциите на производителя.

6. Количествена полимеразна верижна реакция в реално време (RT-qPCR)

Общата RNA е изолирана с Quick-RNA Miniprep комплект от Zymo Research (Irvine, CA, USA). Обратната транскрипция е извършена с помощта на cDNA комплект на Canvax FirstStrand (Cordoba, Spain). Експресията на основните адипогенни гени е оценена с RT-qPCR, използван е Sso EvaGreen SuperMix на система CFX96 (Bio-Rad). Относителната генна експресия е определена чрез сравнителен метод на прагов цикъл ($\Delta\Delta C_T$) на софтуера CFX Maestro (Bio-Rad) спрямо рибозомен протеин L13a (RPL13A) и бета-тубулин (TUBB) като референтни гени.

7. Детекция на протеин чрез имуноблот анализ

Тоталните протеинови лизати са приготвени и анализирани чрез имуноблот техника, както е описано по-рано (Vasileva et al., 2021). Еквивалентни количества от 30 μg протеинови проби са разделени посредством електрофореза с натриев додецил сулфат-полиакриламиден гел и прехвърлени на нитроцелулозни мембрани. Данните за протеините са нормализирани спрямо референтен протеин посредством софтуера Image Lab 6.0.1 (Bio-Rad).

8. Модел на глюкозо-предизвикано натрупване на липиди при *C. elegans*

Нематоди от див тип N2 Bristol *C. elegans* и *Escherichia coli* OP50 (*E. coli* OP50) са закупени от Caenorhabditis Genetic Centre (CGC, University of Minnesota). Нематодите са култивирани при условия съответстващи с процедурата на производителя. Възрастово-синхронизирана популация е получена посредством третиране с разтвор на белина и натриево основа на възрастните индивиди, намиращи се в период на репродукция. По време на първите два ларвни стадия (около 24 часа), нематодите са култивирани върху петрита с хранителна среда NGM с или без включена 2% глюкоза. На следващия етап нематодите са прехвърлени върху свежи петрита с NGM, предварително третирани с добавени към хранителния източник - MACK (25, 50 и 100 μ M) или 0.1% DMSO като носител (Vehicle). Като анти-обезогенна контрола е използван орлистат (ORST) в концентрация от 12 μ M. Дозите, използвани за третирането с MACK са избрани на база анализ за жизнеспособност.

Използваната бактериална култура от *E. coli* OP50 е топлинно-инактивирана, с цел да се предотврати вероятността от метаболизиране на ORST и MACK от самата бактерия. Събраните чрез смиване с M9 буфер нематоди в четвърти ларвен стадий (L4) са подложени на следните анализи: оцветяване на липидните натрупвания и конфокална микроскопия, както и изолиране на тотална RNA.

9. Тест за жизнеспособност при нематоди

Степента на повлияване на жизнеспособността на нематодите 48 часа след проведеното третиране е оценена посредством 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолиев бромид (MTT) тест, описан детайлно в Savova et al. (2022).

За да се потвърди, че чистото активно вещество MACK не оказва влияние върху жизнеспособността на нематодите, е извършен MTT тест. Синхронизирани нематоди във фаза L4 са третирани с MACK в концентрации от 10 до 200 μ g/mL.

10. Определяне на двигателна активност при *C. elegans*

Броя огъвания на нематодите за време от 30 секунди е отчетен, както е посочено в Savova et al. (2022). След третиране с избраните експериментални концентрации на MACK, ларвите се трансферират върху NGM без *E. coli* OP50, за да се адаптират. Броят огъвания на нематода в капка (5 μ L) от M9 буфер се отчитат за време от 30 секунди, като за анализа са използвани 15 нематода от група.

11. Хемотаксис в отговор на експериментално третиране при *C. elegans*

Caenorhabditis elegans използва своята силно развита хемосензорна система, съставена от амфидни, фазмидни и вътрешни лабиални неврони при търсене на храна, намиране на партньор, снасяне на яйца, както и за избягване на патогени и токсични вещества (Queiros et al., 2021). По този начин, в контекста на третиране с природни молекули, хемотаксисният анализ дава информация както за невробиологичното състояние на моделния организъм, така и за поведенческите реакции на привличане/отблъскване и възможност да се проследи афинитета на нематода към дадено вещество.

12. Оцветяване на натрупаните липидни капки при нематоди

Като багрило се използва Nile red (NR). Оцветяването на липидните натрупвания и последващото им количествено определяне при *C. elegans*, е съгласно протокола цитиран в Savova et al. (2022). Представителните изображения се анализират посредством софтуер (ImageJ), а флуоресцентния сигнал се преобразува в corrected total cell fluorescence (CTCF).

13. Количествена полимеразна верижна реакция в реално време (RT-qPCR) за анализ на РНК и микроРНК в *in vivo* модел на *C. elegans*

Групи от по приблизително 3000-4000 нематода третирани съответно с MACK (100 μ M), орлистат (12 μ M), хибридна комбинация между MACK (100 μ M) и орлистат (12 μ M), с включена група с носител (vehicle; с крайна концентрация от 0.4% DMSO) са използвани за изолиране на РНК с помощта на PureZol (Bio-Rad), в съответствие с поток на производителя. Софтуер CFX Maestro 1.1 (Bio-Rad) е използван за количествен анализ на експресията на РНК чрез прилагане на $\Delta\Delta$ CT метод. Като ендогенни контроли са използвани РНК на *iscu-1* и *mdh-1*, резултатите са нормализирани спрямо група третирана носител.

Обратна транскрипция на микроРНК е извършена с помощта на steam-loop праймери и Revert Aid H Minus First Strand комплект за синтез на cDNA на Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Посредством софтуера CFX Maestro 1.1 (Bio-Rad) е извършен количествен анализ на експресията на микроРНК чрез $\Delta\Delta$ CT метод. Използвани са референтни микроРНК съответно, екзогенна контрола *ath-miR-159a* и ендогенна *U18*.

14. Определяне на протеинови нива чрез имуноблот анализ при *in vivo* модел на *C. elegans*

Общите протеинови лизати от нематоди са получени с помощта на ледено студен RIPA буфер и са определени количествено чрез реактив на Брадфорд. Равни количества от протеиновите лизати са подложени на електрофореза с 10 % натриев додецил сулфат-полиакриламиден гел и прехвърлени на нитроцелулозна мембрана блокирана за 1 час при стайна температура в 5% (w/v) обезмаслено мляко в Tris буфериран физиологичен разтвор. Извършена е инкубация за една нощ с първичното анти-pAMPK антитяло с последвана от 1 час инкубация с SB700-конюгирано вторично антитяло. Визуализацията е извършена чрез ChemiDoc MP система (Bio-Rad). Количеството на таргетния протеин е нормализирано спрямо β -актин с помощта на софтуера Image Lab 6.0.1 (Bio-Rad).

15. Статистическа оценка

Получените данни са анализирани с помощта на софтуера SigmaPlot v11.0 от Systat Software GmbH (Erkrath, Germany) и представени като средна стойност $\pm$ стандартна грешка на средната стойност (SEM). Различията между групите е определена с *t*-тест на Student, където е подходящо, или еднопосочен анализ на дисперсиите (ANOVA), последван от *post hoc* анализ на Bonferroni, когато се сравняват повече от две групи. Стойностите на **p* < 0.05 и ***p* < 0.001 са приети за статистически значима разлика.

IV. РЕЗУЛТАТИ

1. Метаболитно профилиране на експерименталните екстракти

1.1. Екстракт от надземни части на цариче – *A. monticola*

Фитохимичното охарактеризиране на екстракт от ALM е извършено чрез ЯМР-базирано метаболитно профилиране (Фигура 1). Според анализа на данните от протонния (^1H) ЯМР спектър най-разпространените сигнали съответстват на органичните киселини и флавоноидните представители – астрагалин, катехин, кверцетин, кверцетин-3-*O*- β -глюкуронид, кверцитрин, изокверцетин, рутин, ванилова киселина и витексин (Таблица 1).

Таблица 1. Идентифицирани метаболити в екстракт от *A. monticola*. Отчетено химично отместване (δ) и константа на сдвояване (J) на метаболитите в екстракта посредством сравнение на получените ЯМР спектри с литературни данни (Chang et al., 2009; Kuruüzüm-uz et al., 2013; Wolfender et al., 2013; Ganbaatar et al., 2016; Mandrone et al., 2018)

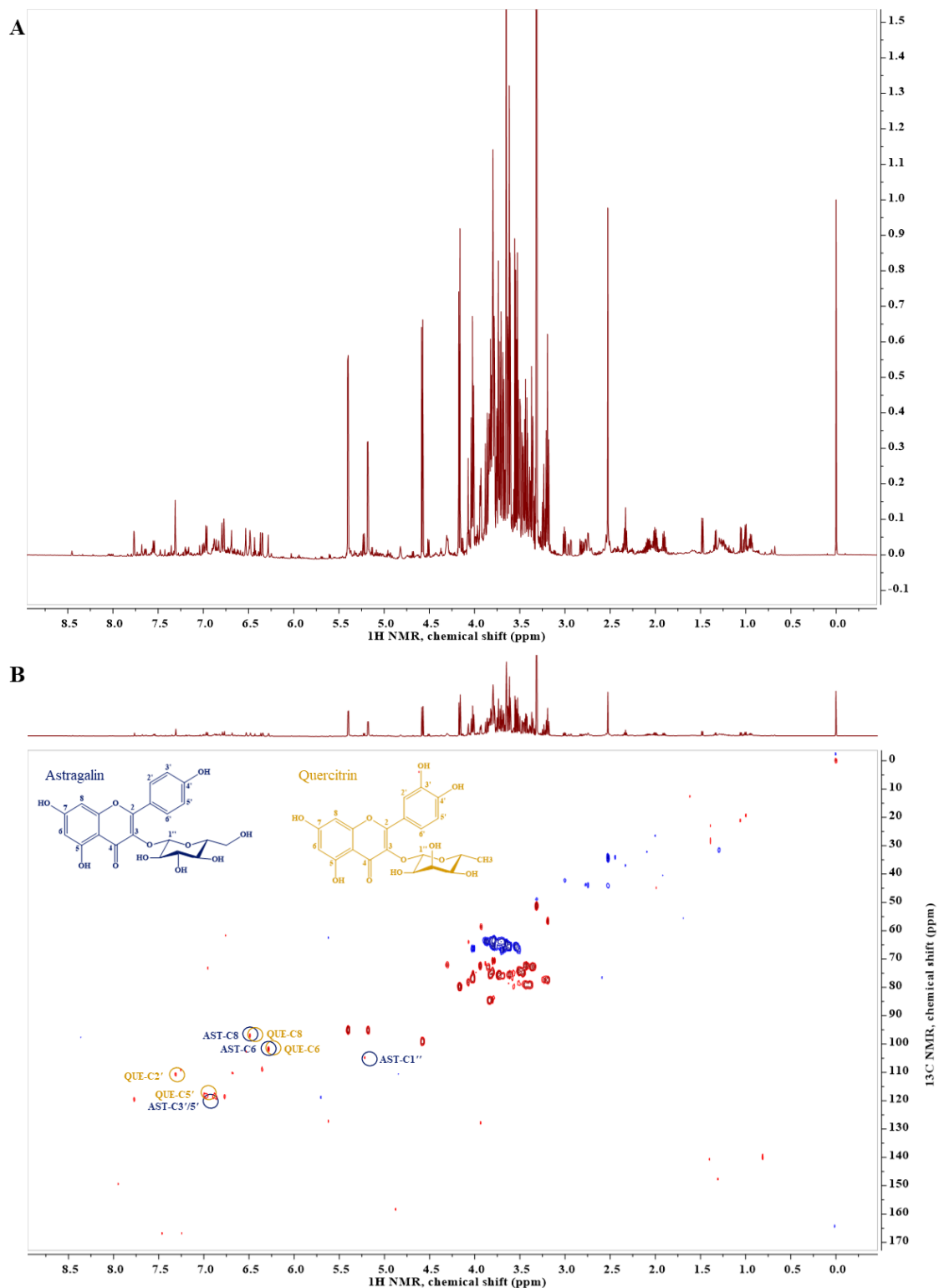
Метаболити	Химично отместване (δ , ppm)	Константа на сдвояване (J , Hz)
<i>Аминокиселини</i>		
Аланин	1.48	(d, $J = 7.4$)
Треонин	1.33	(d, $J = 6.5$)
Валин	1.00/1.02	(d, $J = 7.2$)/(d, $J = 7.0$)
<i>Захари</i>		
α -Глюкоза	5.18	(d, $J = 3.7$)
β - Глюкоза	4.58	(d, $J = 7.8$)
Захароза	5.40/4.17	(d, $J = 3.6$)/(d, $J = 8.7$)
Фруктоза	3.62/3.69/4.03	(m)/(m)/(m)
<i>Органични киселини</i>		
Фумарова киселена	8.45	(s)
Янтарна киселина	2.52	(s)
Ванилова киселина	7.58/7.55/6.87/3.93	(d, $J = 2.0$)/(dd, $J = 8.5; 2.2$)/(d, $J = 8.2$)/(s)

Флавоноиди и флавоноидни гликозиди

Астрагалин	6.28/6.48/6.97/8.04/5.23	(d, J = 2.0)/(d, J = 2.0)/(d, J = 8.5)/(d, J = 8.6)/(d, J = 7.8)
Изокверцитрин	6.28/6.48/7.68/6.97/7.55/5.23	(d, J = 2.0)/(d, J = 2.0)/(d, J = 2.0)/(d, J = 8.5)/(dd, J = 8.5; 2.2)/(d, J = 7.8)
Каемпферол	6.28/6.48/7.00/8.04	(d, J = 2.0)/(d, J = 2.0)/(d, J = 8.5)/(d, J = 8.6)
Кверцитрин	6.28/6.42/7.31/7.00/7.55/5.27 0.97	(d, J = 1.8)/(s)/(d, J = 2.0)/(d, J = 8.5)/(dd, J = 8.4; 2.0)/(d, J = 1.6)/(d, J = 6.3)
Кверцетин	6.28/6.48/7.72/6.97/7.64	(d, J = 2.0)/(d, J = 2.0)/(d, J = 2.0)/(d, J = 8.5)/(dd, J = 8.5; 2.3)
Кверцетин-3-О-β- глюкуронид	7.73/7.55/6.87/6.42/6.28/5.23	(d, J = 2.0)/(dd, J = 8.5; 2.2)/(d, J = 8.2)/(d, J = 2.2)/(d, J = 2.2)/(d, J = 7.8)
Рутин	6.28/6.48/7.68/6.97/7.64/5.06 /4.54	(d, J = 2.0)/(d, J = 2.0)/(d, J = 2.0)/(d, J = 8.5)/(dd, J = 8.8; 2.4)/(d, J = 8.2)/(d, J = 2.0)
Витексин	6.69/6.37/8.00/7.92/7.00/5.10	(s)/(s)/(d, J = 8.9)/(s)/(d, J = 8.5)/(d, J = 10.1)
<i>Други</i>		
Инозитол	3.91/3.61/3.20	(m)/(m)/(m)
γ-Аминобутирова киселина	1.90/2.32/3.01	(m)/(t, J = 7.5)/(t, J = 7.5)

Структурите на някои от молекулите като AST и QUE са наблюдавани както в ^1H ЯМР, така и в хетероядрена спектроскопия на единична квантова кохерентност (HSQC). По отношение на астрагалин, в двумерния HSQC спектър на ALM екстракт са наблюдавани няколко сигнала, типични за ароматните водороди: два дублета при δ_{H} 6.28 и δ_{H} 6.46, които корелират с въглеродния резонанс при δ_{C} 101.66 и δ_{C} 97.02 и съответства на *мета*-свързване на H6 и H8 протони, съответстващи на флавоноидния А-пръстен. Други два дублета с константи на *орто*-свързване при δ_{H} 6.97 и δ_{H} 8.04 са корелирани с δ_{C} 118.36 и δ_{C} 131.33 и съответстват на H3'/5' и H2'/6', което предполага два *пара*-

заместени В-пръстена от флавоноиди. Аномерният протон (H1'') на глюкозата се появява при δ_H 5.23/ δ_C 105.12. Сравнено с публикувани по-рано данни (Rezende et al., 2019) може да се счете, че структурата съответства на астрагалин.



Фигура 1. Представителни ЯМР спектри на екстракт от *Alchemilla monticola*. Протонен ^1H ЯМР (600 MHz) спектър (A) и данни от хетероядрена единична квантова кохерентна

спектроскопия (^1H - ^{13}C HSQC) с отбелязани характерните за асрагалин (AST) и кверцитрин (QUE) сигнали (B).

При кверцитрин, пресечната точка на сигналите δ_{H} 5.27/ δ_{C} 93.36 предполага наличието на α -свързана рамнозна част. Протоните в А-пръстена (H6 и H8) на флавоноидното ядро са разпознати съгласно HSQC корелациите δ_{H} 6.28/ δ_{C} 101.66 и δ_{H} 6.42/ δ_{C} 97.02. Корелацията между сигнали при δ_{H} 7.31/ δ_{C} 110.98, δ_{H} 7.00/ δ_{C} 117.98 и δ_{H} 7.5/ δ_{C} 125.02 съответстват на протони H2', H5' и H6' от В-пръстена, което предполага кверцитриново ядро (Wolfender et al., 2013).

Въз основа на резултатите от метаболитното профилиране на ALM са избрани AST и QUE за по-нататъшна *in silico* оценка на анти-адипогения потенциал.

1.2. Екстракт от корени на гръмотрън – *O. spinosa*

Метаболитното профилиране на OSR също е извършено чрез анализ на едно- и двумерни ЯМР спектри. В протонния спектър най-разпространените сигнали съответстват на ононин, сативанон, оногенин и маакияин (Фигура 2 и Таблица 2).

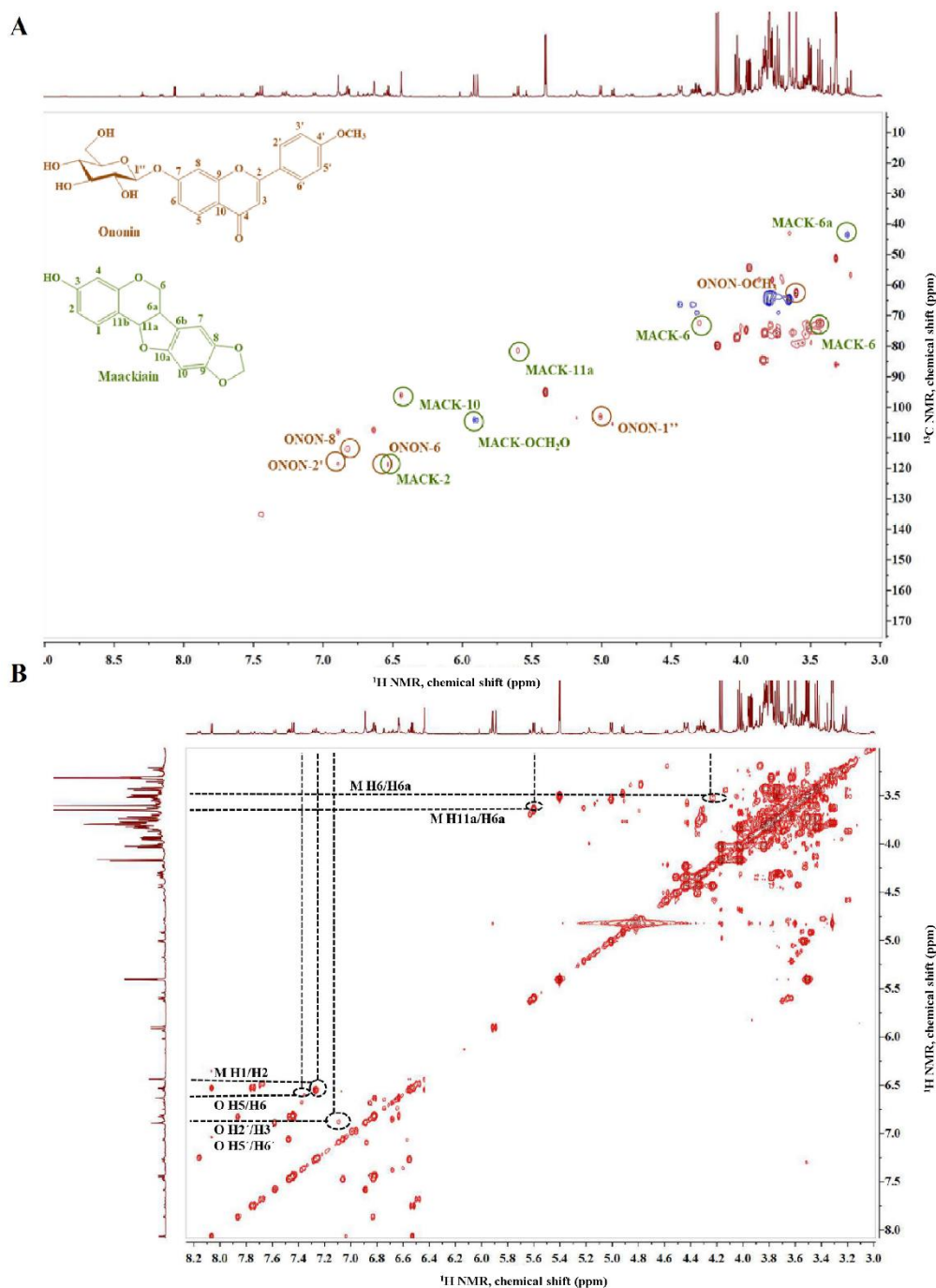
Таблица 2. Идентифицирани метаболити в екстракт от *O. spinosa*. Химични отмествания (δ) и константи на сдвояване (J) на идентифицираните метаболити чрез съответните им ^1H ЯМР спектри (Bernhardt et al., 2000; Park et al., 2003 and Wu et al., 2020).

Метаболити	Химично отместване (δ , ppm)	Константа на сдвояване (J , Hz)
<i>Аминокиселини</i>		
Аланин	1.48	(d, J = 7.3)
Глутамин	2.13/2.46	(m)/(m)
Валин	1.00	(d, J = 7.0)
Лецитин	0.96	(d, J = 7.0)
<i>Захари</i>		
β - Глюкоза	4.58	(d, J = 7.9)
Фруктоза	4.17	(d, J = 8.6)
Захароза	5.40	(d, J = 3.8)
<i>Органични киселини</i>		
Оцетна киселина	1.96	(s)

Фумарова киселина	6.54	(s)
Ябълчна киселина	2.82/2.95	(dd, $J = 16.9, 8.4$)/(dd, $J = 16.9, 4.0$)
<i>Флавоноиди и флавоноидни гликозиди</i>		
Ононин	6.02/7.38/6.55/6.84/6.96/ 6.82/5.01/3.60	(s)/(d, $J = 8.7$)/(dd, $J = 8.3, 2.3$)/(d, $J = 2.50$)/(dd, $J = 8.0, 2.7$)/(dd, $J = 8.6, 2.5$)/(d, $J = 7.6$)/(s)
Сативанон	4.45-4.51/4.30-4.34/4.23/ 7.86/6.55/6.29/3.71/3.78/ 6.56/7.06	(m)/(m)/(dd, $J = 12.2, 5.6$)/(d, $J = 8.9$)/(dd, $J = 8.3, 2.3$)/(d, $J = 2.3$)/(s)/(s)/(d, $J = 2.3$)/(d, $J = 8.9$)
Оногенин	4.45-4.51/4.30-4.34/4.23/ 7.86/6.55/6.29/3.71/6.69/ 6.61	(m)/(m)/(dd, $J = 12.2, 5.6$)/(d, $J = 8.9$)/(dd, $J = 8.3, 2.3$)/(d, $J = 2.3$)/(d, $J = 1.0$)/(s)/(s)/(s)
Спинонин	6.13/6.12/6.84/6.55/7.38/ 3.23/2.74/6.89/5.01	(m)/(d, $J = 1.2$)/(d, $J = 2.5$)/(dd, $J = 8.3, 2.3$)/(d, $J = 8.7$)/(dd, $J = 14.1, 7.1$)/(dd, $J = 16.0, 4.2$)/(d, $J = 8.6$)/(d, $J = 7.5$)
Маакияин	7.27/6.55/6.29/3.55/3.23/ 4.23/6.26/6.42/5.60/5.90	(d, $J = 8.4$)/(dd, $J = 8.3, 2.3$)/(d, $J = 2.5$)/(t, $J = 10.6$)/(m)/(m)/(s)/(s)/(d, $J = 7.4$)/(dd, $J = 15.5, 1.0$)
<i>Други</i>		
Мравчена киселина	8.46	(s)
γ -Аминобутирова киселина	1.9/2.32/3.01	(m)/(t, $J = 7.2$)/(t, $J = 7.3$)
Холин	3.21 (s)	3.21 (s)

Структурата на ононина е идентифицирана посредством неговите ^1H ЯМР и HSQC спектри (Фигура 7А). В ^1H ЯМР спектър, трите протона Н-5, Н-6 и Н-8 на пръстена А представляват АВХ спинова система. Сигналът на Н-5 показва константа на свързване $J = 8.7 \text{ Hz}$ ($\delta_{\text{H}} 7.3/\delta_{\text{C}} 131.26$), което потвърждава орто свързването към Н-6 $J = 8.3; 2.3 \text{ Hz}$ ($\delta_{\text{H}} 6.55/\delta_{\text{C}} 114.87$). Сигналът на Н-6 показва освен орто- също и мета свързване към Н-8 с $J = 2.5 \text{ Hz}$ ($\delta_{\text{H}} 6.84/\delta_{\text{C}} 110.37$). Двата сигнала при $\delta_{\text{H}} 6.96 \delta_{\text{C}} 114.92$ ($J = 8.0; 2.7$) и $\delta_{\text{H}} 6.82/\delta_{\text{C}} 110.74$ ($J = 8.6; 2.5$) характеризират В пръстенната система на ароматните протони Н-2'/Н-6' и Н-3'/Н-5'. Сигналите на $-\text{OCH}_3$ групата са открити при

$\delta_{\text{H}} 3.60/\delta_{\text{C}} 63.38$ (s). Константите на свързване на аномерния протонен сигнал H-1', $J = 7.3$ Hz ($\delta_{\text{H}} 5.01/\delta_{\text{C}} 99.81$) доказват наличието на β -глюкопираноза (Bernhardt et al., 2000).



Фигура 2. Спектри от хетероядрена единична квантова кохерентна спектроскопия (^1H - ^{13}C HSQC, А) и ^1H - ^1H хомоядрена корелационна спектроскопия (^1H - ^1H COSY, В) спектри на екстракт от *O. spinosa* и характерни сигнали на ононин (О) и маакияин (М).

Присъствието на маакияин е потвърдено чрез набор от пикове, съответстващи на скелета на птерокарпан, т.е. сигналите като δ_H 5.60/ δ_C 80.50 (d, $J = 7.4$ Hz), δ_H 4.2/ δ_C 72.89 (m), δ_H 3.55/ δ_C 72.89 (t, $J = 10.7$) и δ_H 3.23/ δ_C 43.23 (m) са разпределени съответно към H-11a, H-6, H-6 и H-6a. В спектрите е забелязан и двойният дублет при δ_H 5.90/ δ_C 104.31 ($J = 5.5$; 1.0 Hz), съответстващ на -OCH₂O- и по един синглет при δ_H 6.42/ δ_C 96.22 (s) и δ_H 7.26/ δ_C 113.25, съответстващ на H-10 и H-8, съответно, предполагащи метилендиокси част от ароматния D пръстен. Освен това са идентифицирани дублет при δ_H 6.29/ δ_C 104.5 ($J = 2.5$ Hz; H-4), двоен дублети при δ_H 6.5/ δ_C 111.4 ($J = 8.4$; 2.3 Hz) и дублет при δ_H 7.27/ δ_C 124.56 ($J = 8.4$; H-1), присвоен на системата ABX на A пръстена (Park et al., 2003; Wu et al., 2020).

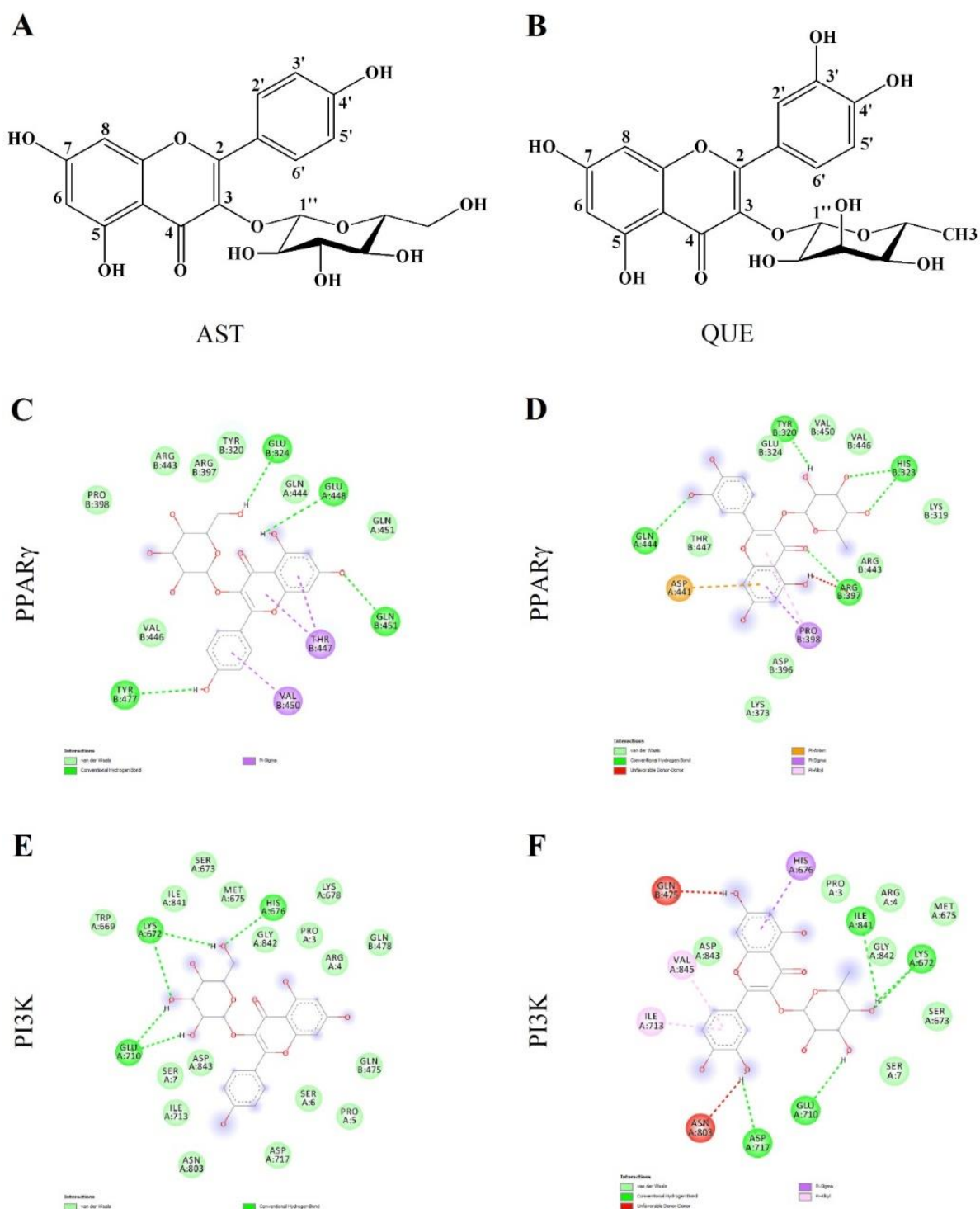
Базирано на метаболитното профилиране на OSR, ONON и MACK са избрани за обект за по-нататъшна *in silico* оценка на анти-адипогения потенциал.

2. *In silico* докинг симулация

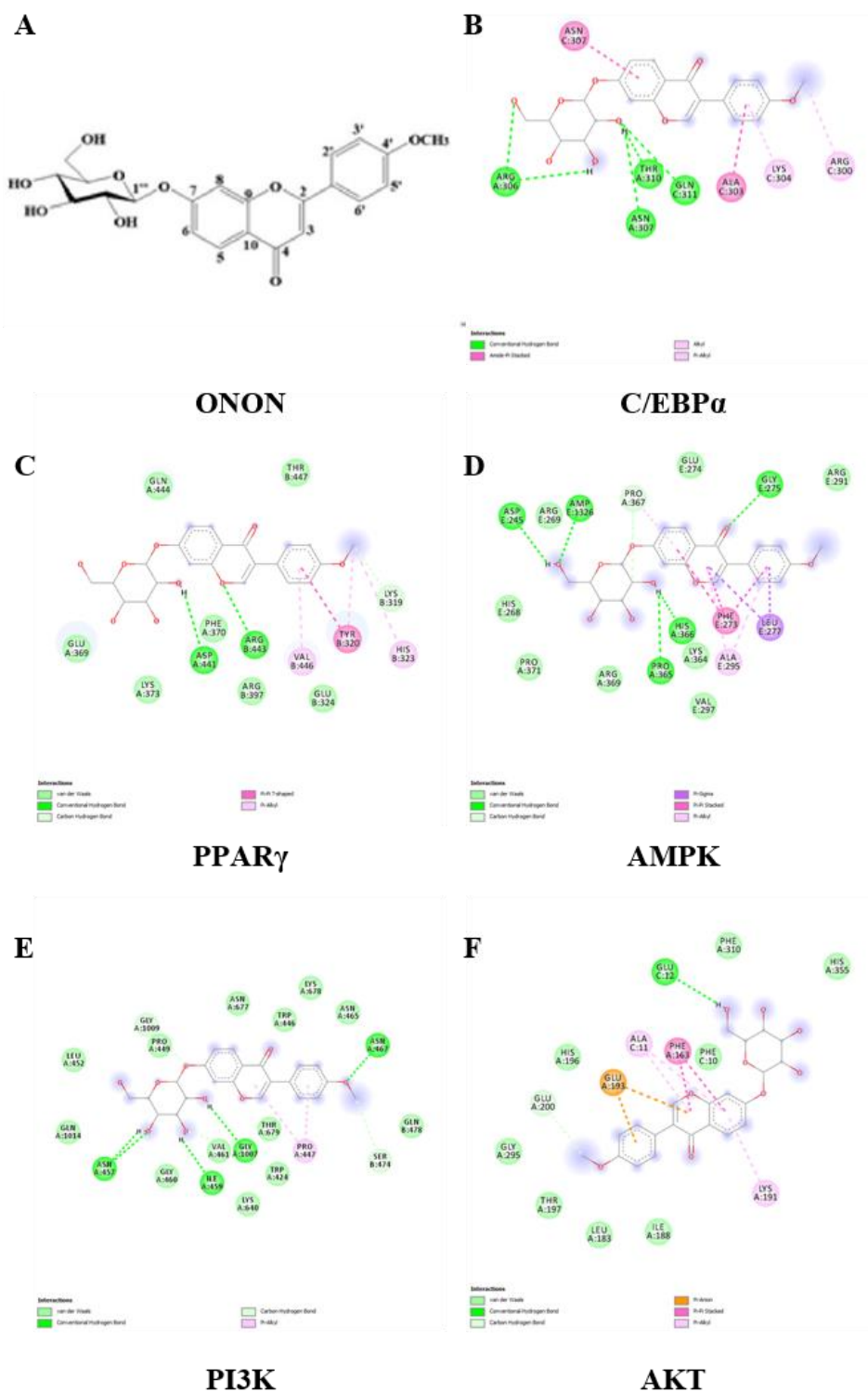
Афинитетът на избраните чисти вещества към протеините е изразен по отношение на свободната енергия на свързване (ΔG) и константата на свързване (K_i ; Таблица 3 за AST, QUE и Таблица 4 за MACK и ONON). Всички изчислени афинитетни константи за AST, са в диапазон 0.2-24.4 μ M, за QUE 0.4-24.4 μ M, за ONON 0.06-14.7 μ M и MACK 0.4-67.2 μ M. Най-ниските стойности на свободната енергия на свързване за AST и QUE са към PI3K и PPAR γ , за ONON и MACK към AMPK, PI3K и PPAR γ . Ориентацията и местата им за свързване с таргетните протеини са представени на Фигура 3 за AST, QUE и Фигура 4 и 5 за ONON и MACK.

Таблица 3. Свободна енергия на свързване (ΔG , kcal/M) и афинитетна константа (K_i , μ M) за QUE и AST към структурата на таргетния протеин.

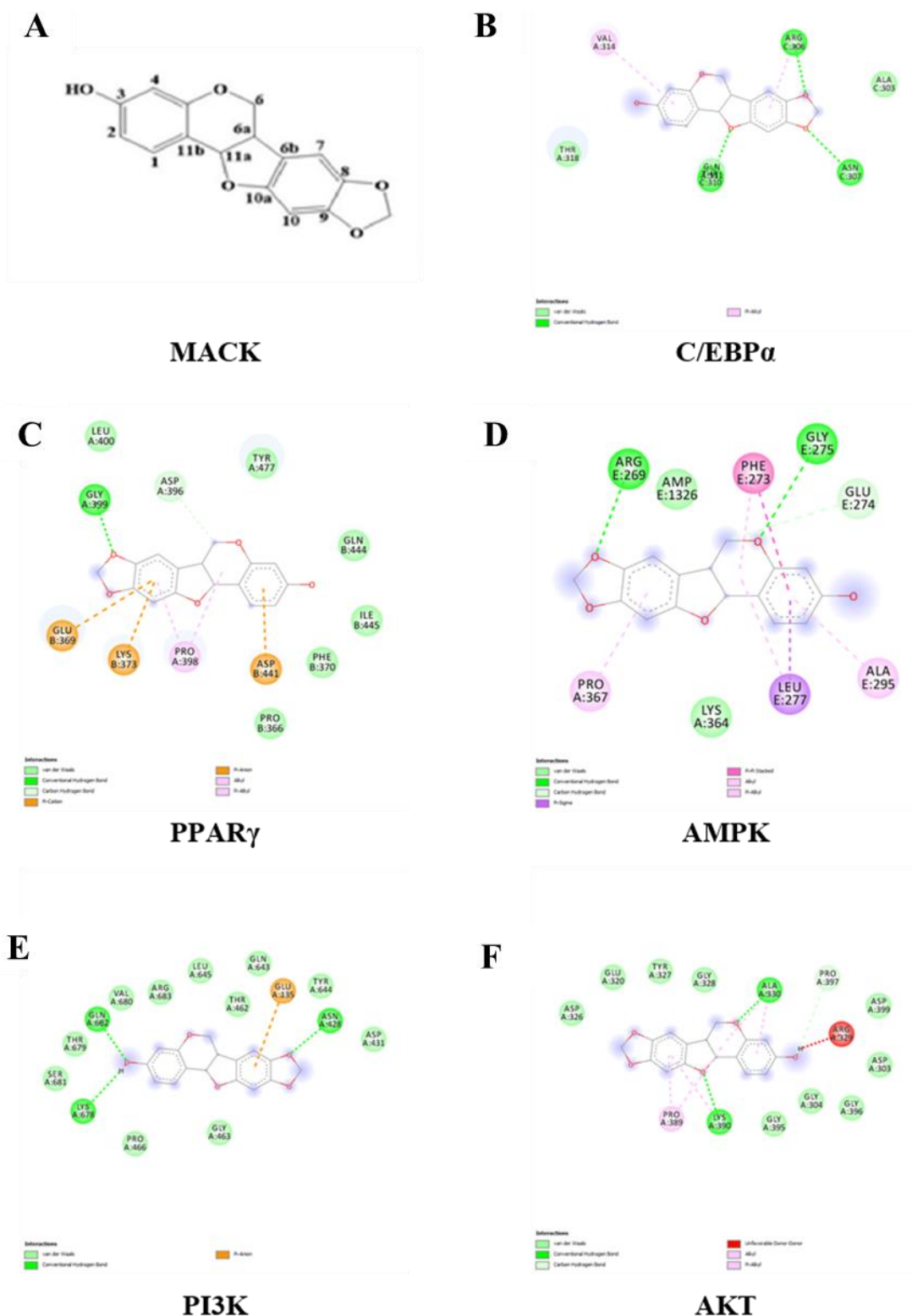
Таргетни протеини	Кверцитрин	Астрагалин
C/EBP α (PDB: 1NWQ)	-6.3 kcal/M; 24.4 μ M	-6.3 kcal/M; 24.4 μ M
PPAR γ (PDB: 2P4Y)	-7.8 kcal/M; 1.9 μ M	-7.3 kcal/M; 4.5 μ M
АКТ (PDB: 1O6L)	-6.8 kcal/M; 10.5 μ M	-6.7 kcal/M; 12.4 μ M
PI3K (PDB: 5ITD)	-8.7 kcal/M; 0.4 μ M	-9.2 kcal/M; 0.2 μ M



Фигура 3. Астрагалин (AST) и кверцитрин (QUE) показват силен афинитет към протеиновите структури на PPAR γ и PI3K. Химично наименование на AST: 5,7-дихидрокси-2-(4-хидроксифенил)-3- [(2S, 3R, 4S, 5S, 6R)-3,4,5-трихидрокси-6-(хидроксиметил)-оксан-2-ил]-оксихромен-4-он (A) и на QUE: 2-(3,4-дихидроксифенил)-5,7-дихидрокси-3-[(2S, 3R, 4R, 5R, 6S)-3,4,5-трихидрокси-6-метилоксан-2-ил]-оксихромен-4-он (B). Потенциални молекулни взаимодействия между AST и PPAR γ (C); QUE и PPAR γ (D); AST и PI3K (E); QUE и PI3K (F).



Фигура 4. Спрямо извършените изчисления, ононин (ONON) се свързва с най-силен афинитет към протеиновите структури на PPAR γ , PI3K, AMPK и AKT. Химично наименование на ONON: 3-(4-метоксифенил)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-трихидрокси-6-(хидроксиметил)оксан-2-ил]оксихромен-4-он (A). Потенциални взаимодействия между: ONON и CEBP α (B); ONON и PPAR γ (C); ONON и AMPK (D); ONON и PI3K (E); ONON и AKT (F).



Фигура 5. Теоретично, маакияин (MACK) се свързва с най-силен афинитет към PPAR γ , PI3K, AMPK и AKT. Химично наименование на MACK: (1R,12R)-5,7,11,19-тетраоксапентацикло-[10.8.0.0^{2,10}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоза-2,4(8),9,13(18),14, 16- хексаен-16-ол (A). Потенциални взаимодействия между: MACK и CEBP α (B); MACK и PPAR γ (C); MACK и AMPK (D); MACK и PI3K (E); MACK и AKT (F).

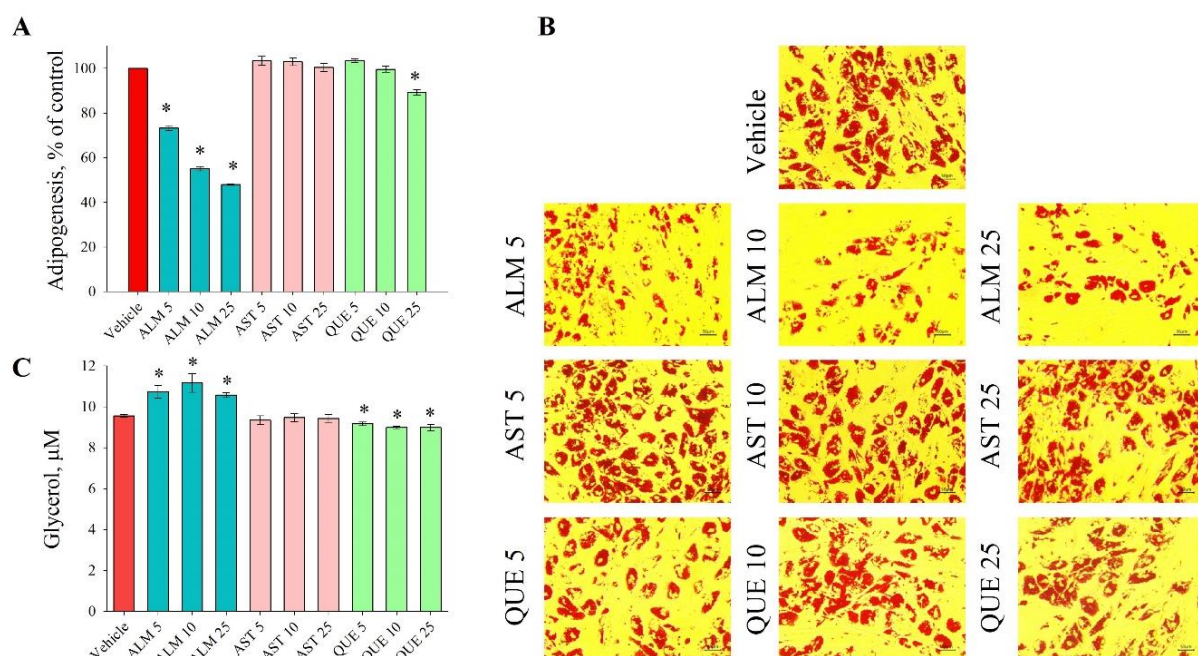
Таблица 4. Свободна енергия на свързване (ΔG , kcal/M) и афинитетна константа (K_i , μM) за ONON и MACK към структурата на съответния таргетен протеин

Таргетни протеини	Ононин	Маакияин
C/EBP α (PDB: 1NWQ)	-6.6 kcal/M; 14.7 μM	-5.7 kcal/M; 67.2 μM
PPAR γ рецептор (PDB: 2P4Y)	-7.9 kcal/M; 1.6 μM	-7.9 kcal/M; 1.6 μM
AMPK (PDB: 4CFF)	-9.9 kcal/M; 0.06 μM	-8.8 kcal/M; 0.4 μM
AKT (PDB: 1O6L)	-7.4 kcal/M; 3.8 μM	-7.8 kcal/M; 1.9 μM
PI3K (PDB: 5ITD)	-9.0 kcal/M; 0.3 μM	-8.6 kcal/M; 0.5 μM

3. Оценка на анти-адипогенния потенциал на екстракт от *A. monticola* и астрагалин (AST) и кверцетин (QUE) при *ин vitro* модел на човешки адипоцити

3.1. Адипогенеза и липолиза при третиране с екстракт от *A. monticola* и избрани чисти вещества

Натрупването на липиди е понижено в използваната моделна система на човешки адипоцити третирани с екстракт от *A. monticola*. Оценката на натрупаните липиди с ORO анализ показва значителна анти-адипогенна активност на ALM (Фигура 6).



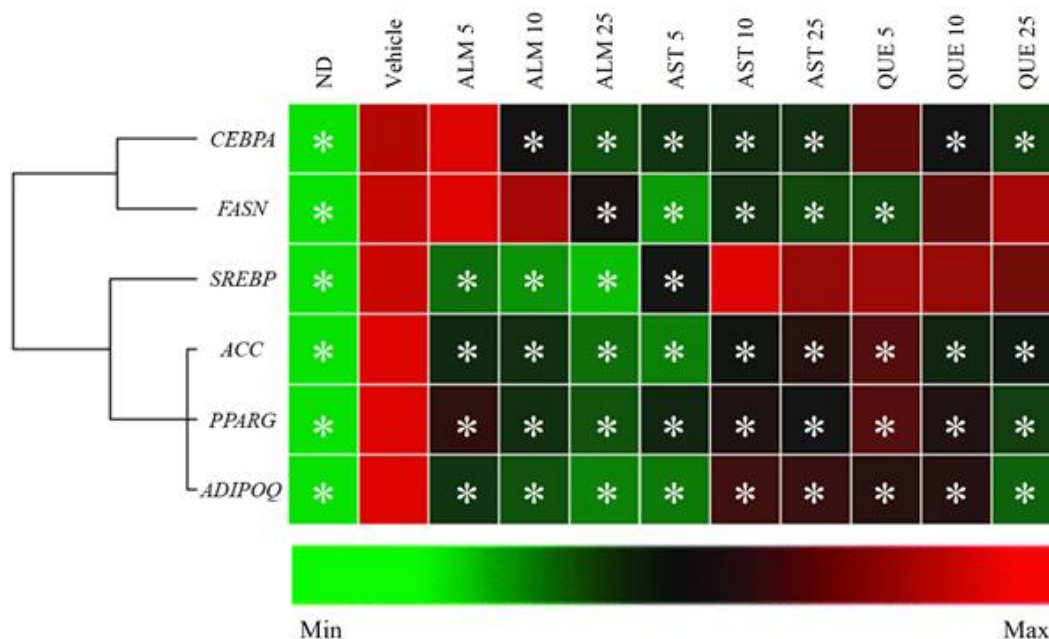
Фигура 6. Екстракт от *A. monticola* (ALM) намалява натрупването на липиди в човешки адипоцити. Съдържанието на липиди, представено като процент от контролната група (Vehicle), на адипоцити третирани с ALM 5, 10 и 25 $\mu g/mL$, астрагалин (AST) 5, 10 и 25 μM , кверцитрин (QUE) 5, 10 и 25 μM от ORO анализа (A). Представителни

изображения (увеличение $\times 20$) на всички експериментални групи след ORO оцветяване (B). Оценка на свободен глицерол в културалната среда на ден 9 на диференциация (C). Данните са изразени като средна стойност $\pm$ SEM, * $p < 0.05$ в сравнение с групата с носител (Vehicle, 0.2% DMSO).

Резултатите показват, че третирането с екстракт от ALM повишава базалната липолиза, което е видно от повишеното количество свободен глицерол в хранителната среда (Фигура 6C). В този експеримент нито адипогенезата, нито процесите на липолиза са засегнати от третирането с AST (Фигура 6A, 6C). По отношение на ефекта от QUE е наблюдавано значимо намаляване на натрупаните липиди само при най-високата използвана концентрация (Фигура 6A, 6B), а нивата на липолиза са умерено намалени (Фигура 6C) и при трите приложени концентрации. Тези данни предполагат, че екстрактът от ALM притежава анти-адипогенен потенциал, който може да бъде частично зависим от наличието на AST и QUE в екстракта.

3.2. Анализ на генна експресия чрез RT-qPCR на екстракт от *A. monticola* и чисти вещества

За да се дефинират основните молекулярни пътища на адипогенезата, повлияни от ALM и вторичните ѝ метаболити, са оценени нивата на експресия на информационна RNA на ключови адипогенни фактори и гени от липидния биосинтез чрез RT-qPCR (Фигура 7).



Фигура 7. Анализ на гени от адипоцитна диференциация след третиране с екстракт на *A. monticola* (ALM), астрагалин (AST) и кверцитрин (QUE). Относителна експресия на информационна RNA, нормализирана към групата с носител (vehicle), ($\Delta\Delta C_q$) за ACC,

ADIPOQ, *CEBPA*, *FASN*, *PPARG* и *SREBP-1* от RT-qPCR анализа. Данните са представени като средна стойност $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ спрямо групата с носител – 0.2% DMSO (Vehicle).

Екстрактът от *A. monticola* повлиява сигналния път PI3K/AKT и регулира негативно PPAR γ и C/EBP α . Експресията на *CEBPA* и *PPARG* са понижени при третиране с ALM, AST и QUE при човешки SGBS адипоцити. Освен това по дозозависим начин е потисната експресията на *ADIPOQ* и *SREBP* в резултат на прилагането на екстракт от ALM. В допълнение, липогенните гени *ACC* и *FASN* са със значително потисната експресия при третиране с най-високата концентрация на ALM, което предполага нарушаване на липогенните сигнални пътища. Интерес буди наблюдението, че експресията на *ACC*, *ADIPOQ*, *FASN* е понижена при прилагането на AST и QUE, но при *SREBP*, който действа като техен регулатор, не е отчетена промяна.

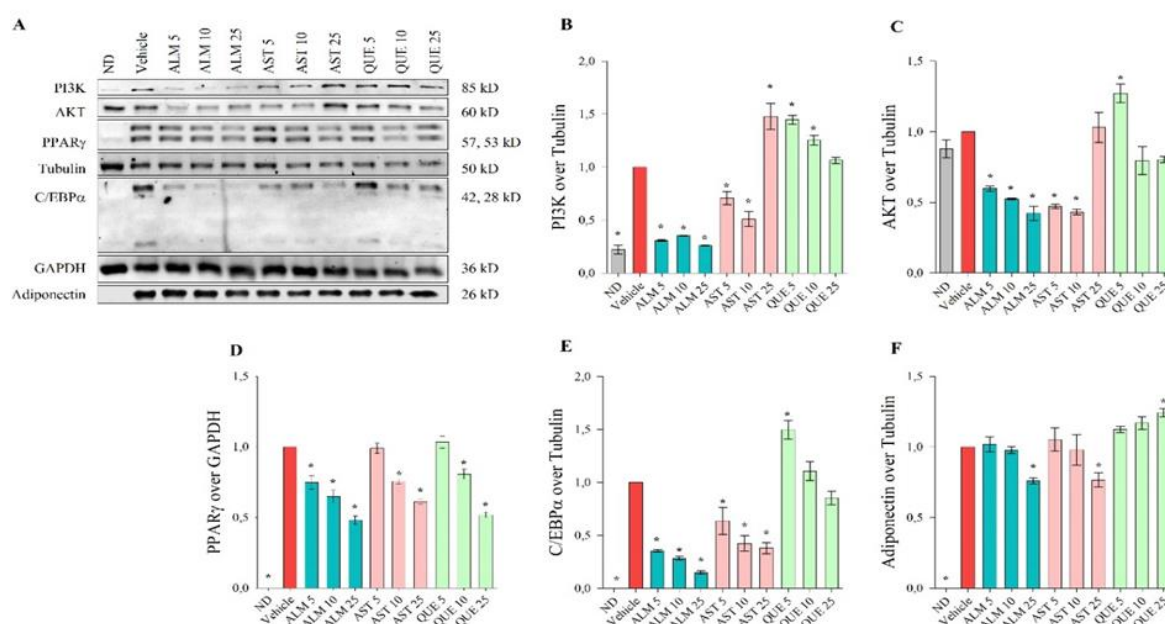
Експресията на *PPARG*, *ADIPOQ*, *ACC* е значително понижена във всички тествани проби (ALM, AST, QUE). Експресията на гена *FASN* е намалена в проби ALM 25 $\mu\text{g/mL}$, AST 5, 10, 25 μM и QUE 5 μM . Същият ефект е наблюдаван и при *CEBPA*, с изключение на третиранията с ALM 5 $\mu\text{g/mL}$ и QUE 5 μM .

3.3. Детекция на протеини посредством имуноблот анализ – *A. monticola* и чисти вещества

Анализа на генната експресия потвърждава концентрационно-зависим инхибиторен ефект на екстракта от ALM върху генната експресия. Въпреки факта, че AST и QUE не са повлияват натрупването на липиди при ORO анализа (Фигура 6C), резултатите от RT-qPCR предполагат, че и двете вещества пречат на транскрипционната регулация по време на адипогенезата. Следователно би могло да се предположи, че AST и QUE участват в наблюдавания анти-адипогенен ефект на екстракта от ALM.

Екстрактът от цариче повлиява сигналния път на PI3K/AKT и регулира негативно PPAR γ и C/EBP α . Адипогенната диференциация се инициира в преадипоцитите при стимулация от външни сигнали като инсулин, кортизол или други растежни фактори. Инсулиновият сигнал се предава през INSR и активира PI3K/AKT пътя, за да индуцира проадипогенни транскрипционни фактори, които да насочат клетъчния път в посока към адипогенеза (Ortega-Molina et al., 2015; Huang et al., 2018). В последствие регулирането на адипогенната диференциация се извършва от CEBP α и PPAR γ (Liu et al., 2014; Park et al., 2016; Vasileva et al., 2021; Zhou et al., 2024). Тяхната свръхекспресия води до

последващо активиране на SREBP-1, което от своя страна повишава липидния биосинтез чрез ACC и FASN. Всичко това води до стимулиране на образуването на липидни капчици. Паралелно с този процес нивата на адипонектин, който е основен адипогенен маркер на зрелия адипоцит, се увеличават (Arner et al., 2019; Liu et al., 2014; Xu et al., 2020). За по-нататъшно изясняване на молекулярния механизъм на действие на ALM и избраните чисти вещества AST и QUE, чрез имуноблот е изследвана протеиновата експресия на PPAR γ , C/EBP α и адипонектин, като ключови адипогенни маркери. В съответствие с решаващата роля на PI3K/AKT сигнализирането в диференциацията на адипоцитите и резултатите от докинг анализа, е установено повишаване на нивата им протеинови молекули в клетките (Фигура 7A).



Фигура 8. Екстракт от *A. monticola* (ALM), астрагалин (AST) и кверцитрин (QUE) намаляват протеиновите нива на ключови адипогенни фактори в човешките адипоцити. Представителни изображения от анализа на имуноблот (A). Относителни нива на PI3K; (B), AKT (C), PPAR γ (D), C/EBP α (E), и адипонектин (F). Тубулин (TUBB) и глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа (GAPDH) се използва като референтни протеини. Резултатите са изразени като средна стойност $\pm$ SEM и са представителни за три независими експеримента. * $p < 0.05$ в сравнение с групата с носител – 0.2% DMSO (Vehicle).

Наблюдава се отрицателно повлияване, както на PI3K (Фигура 8B), така и на AKT (Фигура 8C) от ALM по концентрационно-зависим начин. Тези резултати са в съответствие с резултатите от докинг стимулацията, ORO анализа и изследването на генната експресия. Интерес буди ефектът от третиранията с AST който изглежда е

двупосочен. По-ниските концентрации на AST (до 10 μM) са предизвикали понижаване на нивата на PI3K и AKT, докато най-високата концентрация повишава и двата протеина. Нивата на PI3K и AKT са слабо повишени в резултат на експозицията на QUE. В съответствие с анализа на експресията на информационна RNA, нивата на протеините на PPAR γ , C/EBP α и адипонектин са понижени по концентрационно-зависим начин при третиране с ALM (Фигура 8). Освен това е установено, че AST инхибира PPAR γ (Фигура 8D) и C/EBP α (Фигура 8E) по начин, съответстващ на наблюденията при съответните им гени (Фигура 8C и 8E). Въпреки това, по отношение на адипонектин (Фигура 8F) третирането с AST умерено е намалило нивата и то в най-високата концентрация (25 μM). Интересно е че QUE увеличава експресията на C/EBP α и адипонектин (Фигура 8F) и слабо инхибира PPAR γ при приложение в концентрация от 25 μM (Фигура 8D).

Като цяло тези резултати показват, че ALM потиска процеса на адипогенеза чрез повлияване на сигналния път PI3K/AKT и по този начин инхибира адипогенните маркери PPAR γ , C/EBP α и адипонектин. В допълнение, както AST, така и QUE повлияват в различна степен протеиновите нива на PPAR γ , C/EBP α и адипонектин, което подкрепя хипотезата, че те играят роля в цялостното анти-адипогенно действие на екстракта.

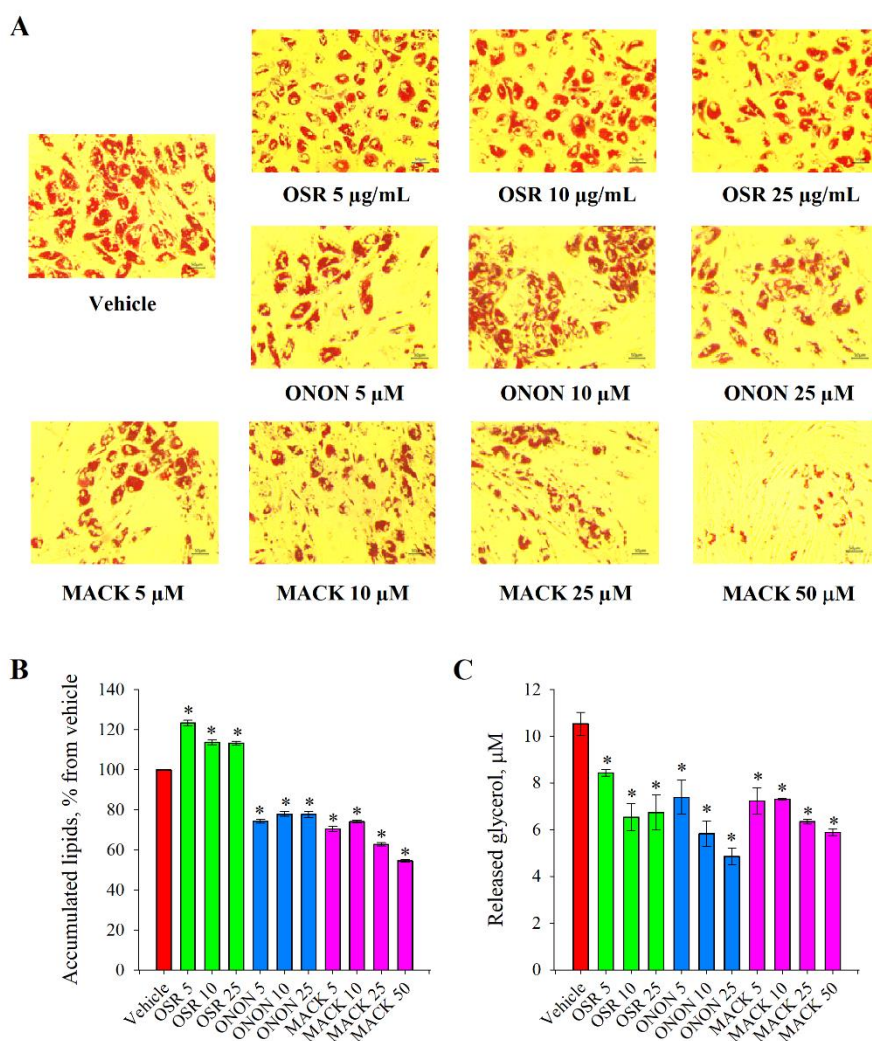
Получените данни от компютърната докинг симулация, анализът на генната експресия и промените в нивата на таргетните протеини предоставят доказателства за потенциалните механизми на анти-адипогенния ефект на ALM и неговия вторичен метаболит AST. Резултатите от имуноблот анализа показаха, че ефекта на ALM най-вероятно е медиран чрез инхибиране на PI3K/AKT сигнализирането. Тези данни дават основание да се изведе механистична хипотеза за директна инхибиторна активност на ALM спрямо C/EBP α и PPAR γ , което води до понижаване на нивата на адипонектин. По същия начин AST понижава C/EBP α и PPAR γ и в по-малка степен тези на адипонектин, PI3K и AKT. Следователно би могло да се предложи, че анти-адипогенният ефект на AST е по-скоро свързан с директно взаимодействие с PPAR γ или C/EBP α , отколкото с модулация на PI3K.

4. Анти-адипогенен ефект при *in vitro* модел на човешки адипоцити третирани с екстракт от *O. spinosa* и негови вторични метаболити

4.1. Адипогенеза и липолиза – *O. spinosa* и вторични метаболити

С цел оценка на натрупването на липиди е извършено оцветяване с липидоразтворимо багрило ORO на диференцирани адипоцити, третирани с *O. spinosa* (5, 10 и 25 $\mu\text{g/mL}$),

ONON (5, 10 и 25 μM) или MACK (5, 10, 25 и 50 μM). Представителните снимки на оцветени адипоцити (Фигура 9A), както и количественото определяне на резултатите (Фигура 9B) демонстрират модулиране на адипогенезата при всички третирания. Наблюдава се увеличение на натрупаните липиди до 123.25, 113.6 и 113.29% за OSR съответно в 5, 10 и 25 $\mu\text{g/mL}$. В контраст на ефекта предизвикан от екстракта от гръмотрън, ONON намалява значително натрупването на липиди с 74.3, 77.85 и 77.63% за 5, 10 и 25 μM . В допълнение MACK намалява натрупването на липиди по концентрационно-зависим начин до: 70.46, 74.09, 62.70 и 54.52% съответно за 5, 10, 25 и 50 μM .



Фигура 9. При всички третирания с екстракт на *O. spinosa* (OSR) и чистите вещества ононин (ONON) и маакияин (MACK) се наблюдава модулиране на адипогенезата. Съдържанието на липиди, представено като процент от контролната група на носителя (Vehicle) на адипоцити, третирани с OSR 5, 10 и 25 $\mu\text{g/mL}$, ононин (ONON) 5, 10 и 25 μM или маакияин (MACK) 5, 10, 25 и 50 μM от ORO анализа (B). Представителни

изображения (увеличение $\times 20$) на всички експериментални групи след ORO оцветяване (A). Оценка на свободен глицерол в културалната среда на ден 9 на диференциация (C). Данните са изразени като средна стойност $\pm$ SEM; всяка експериментална група се състои от шест технически повторения при три независими биологични експеримента.

* $p < 0.05$ в сравнение с групата с носител (Vehicle).

Хидролизата на триглицеридите води до освобождаване на свободни мастни киселини и глицерол. Предвид факта, че освободеният глицерол е продукт на адиполизата, измерването на концентрацията му в културалната среда е използвано, като индикатор за базалната (нестимулираната) липолиза. Екстрактът от OSR и неговите вторични метаболити използвани в това проучване значително намаляват количеството глицерол секретирано от клетките (Фигура 9C). Наблюдавано е намаляване на освободения глицерол при OSR (8.43, 6.53 и 6.73 μM при 5, 10 и 25 $\mu\text{g/mL}$, съответно). Липолизата е дозо-зависимо потисната при ONON и MACK, като най-значителен ефект е наблюдаван при третиране с ONON 25 μM (4.84 μM) и MACK 50 μM (5.87 μM). Този ефект може да допринесе за благоприятното въздействие на тестваните вещества върху подобряване на метаболитната дисрегулация по време на затлъстяване.

Важно е да отбележим, че адипогенезата е значително инхибирана от ONON и MACK и умерено стимулирана от OSR, като най-висок инхибиторен ефект е наблюдаван при MACK 50 μM .

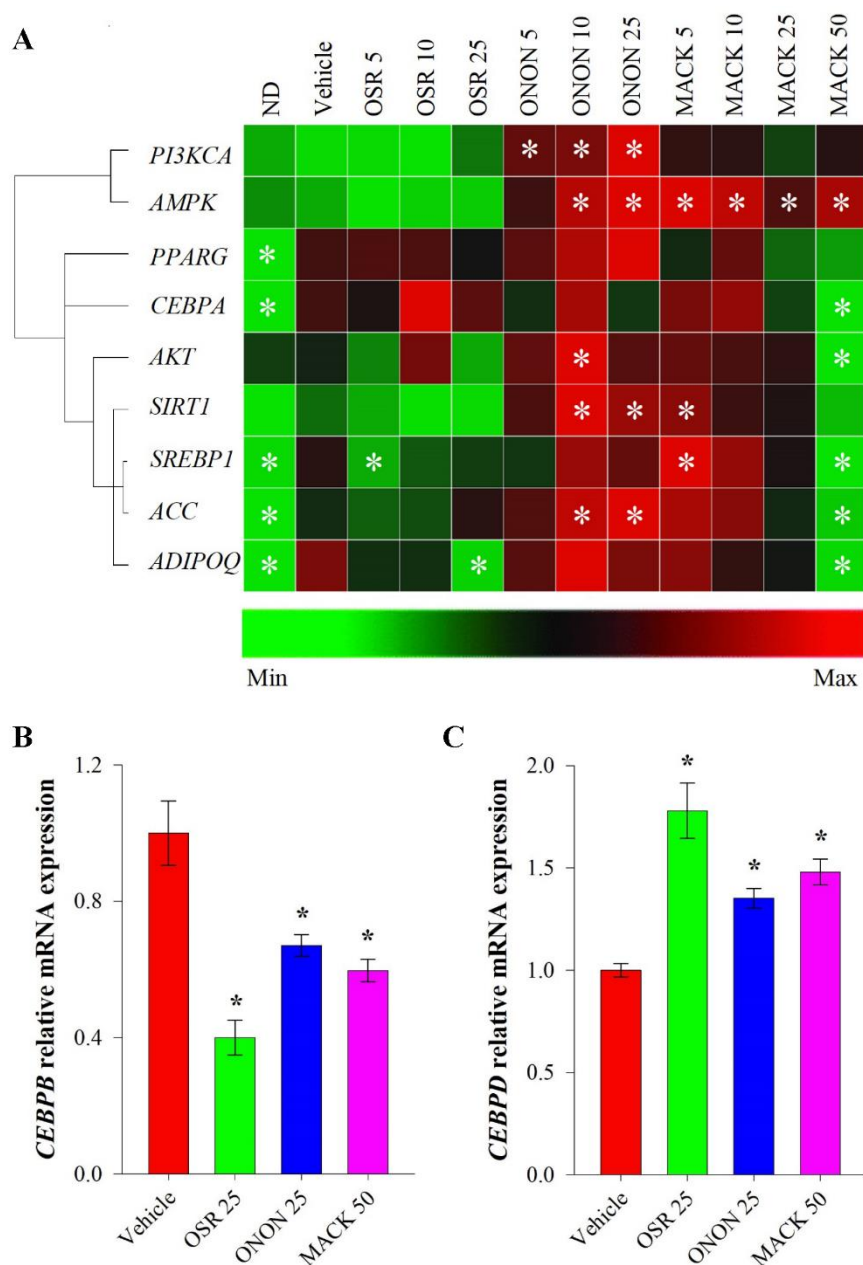
4.2. Анализ на генна експресия чрез RT-qPCR – *O. spinosa* и чисти вещества

Ононин и маакияин повлияват експресията на ключови транскрипционни фактори от ранната и терминалната фази на адипогенната диференциация.

Селектираните вторични метаболити, идентифицирани в екстракта от корени на гръмотрън, а именно ONON и MACK, ефективно променят адипогенния и липолитичния капацитет на адипоцитите. За по-нататъшно изясняване на основните засегнати пътища е изследвана относителната експресия на информационна RNA на ключови транскрипционни фактори, свързани с иницирането на адипогенна диференциация. Селектираните адипогенни и липогенни гени, като *ACC*, *ADIPOQ*, *AKT*, *SERBP1*, *CEBPA*, *PI3KCA*, *PPARG*, *SIRT1*, *AMPK* са изследвани на 9-ия ден от адипоцитната диференциация (Фигура 10A).

За да се провери влиянието върху ранния стадий на адипогенната диференциация, са изследвани относителната генна експресия на *CEBPB* и *CEBPD* като нейни маркери

(Choi et al., 2020, Jo et al., 2019, Mandl et al., 2019, Moseti et al., 2016) на 3-ия ден от диференциацията в адипоцити, третирани с най-високите експериментални концентрации. Наблюдавано е значително намаляване на регулирането на CEBPB (Фигура 10B) и повишаване на регулирането на CEBPD (Фигура 10C) в сравнение с контролната група.



Фигура 10. Топлинна карта и дендрограма на клъстери на относителната генна експресия (A) за всички третирания на 9-ия ден от диференциацията и относителната генна експресия на CEBPB (B) и CEBPD (C) при третирания с най-високите концентрации на OSR, ONON, MACK на 3-ия ден от диференциацията извършени чрез RT-qPCR анализ. Данните са представителни за три независими повторения (средна

стойност $\pm$ SEM), $*p < 0.05$ в сравнение с контролната група. Стойностите на експресия на информационна RNA на целевите гени са нормализирани спрямо получените за *RPL13A* и *TUBB*.

Тези резултати дават основание да допуснем, че OSR и неговите вторични метаболити ONON и MACK се намесват в регулирането на адипогенната диференциация още в нейната начална фаза.

Анализът чрез RT-qPCR показва, че OSR значително понижава експресията на информационна RNA на гена, кодиращ адипонектин – *ADIPOQ* (OSR 25 $\mu\text{g/mL}$) и *SERBP1* (OSR 5 $\mu\text{g/mL}$). Третирането с MACK 50 μM в голяма степен инхибира експресията на *ADIPOQ*, *ACC*, *SERBP1*, *CEBPA*, *AKT* и повишава експресията на *AMPK*. Повишената експресия на *AKT* е демонстрирана от ONON 10 μM . В групите третирани с ONON 10 и 25 μM , генната експресия на *PI3KCA*, *SIRT1*, *AMPK*, *ACC* е повишена статистически значимо.

Директното взаимодействие между *SIRT1* и *AMPK* е свързано в голяма степен с регулирането на липидния метаболизъм. Например, *SIRT1* стимулира фосфорилирането на *AMPK* и по-нататъшното инхибиране на адипогенезата и липогенезата чрез понижаване експресията на липогенните гени (Lee et al., 2019, Liou et al., 2020). Настоящия експеримент показва, че ONON 10, 25 μM и MACK 5, 10, 25, 50 μM повишават експресията на *AMPK*. Освен това, е анализирана и експресията на информационна RNA на *SIRT1*, с цел да се установи дали участва в ефекта на ONON и MACK върху адипоцитната диференциация и липидния метаболизъм.

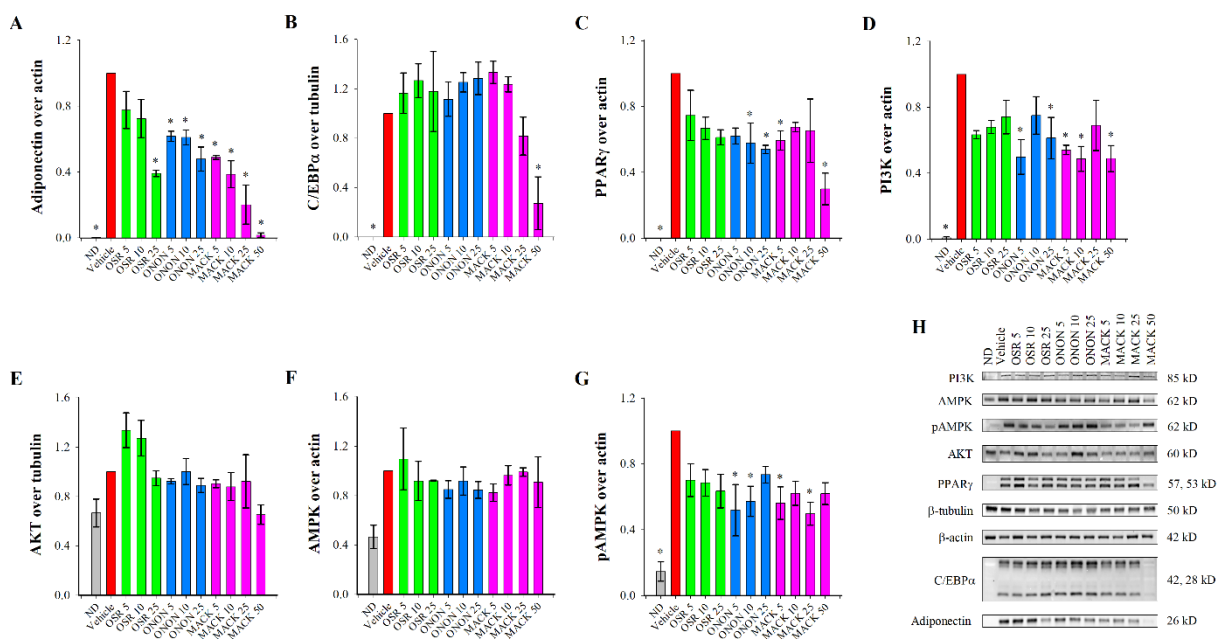
Допуснато е, че ONON 10, 25 μM и MACK 5 μM намалят натрупването на липиди чрез увеличаване на експресията на информационна RNA на *SIRT1* и *AMPK*. Значителния анти-адипогенен ефект на MACK 50 μM е придружен от потисната генна експресия на основни транскрипционни фактори като *SERBP1*, *CEBPA* и *ACC*.

В обобщение на всички данни от анализа на генната експресия се установи, че MACK и ONON повлияват експресията на множество транскрипционни фактори както от ранната, така и от терминалната фаза на адипогенната диференциация.

4.4 Определяне нивата на протеини чрез имуноблот анализ – *O. spinosa* и чисти вещества
Адипоцитната диференциация е сложен и прецизно регулиран процес, задействан от различни стимули, чиято ранна фаза се координира от C/EBP β и C/EBP δ , докато терминалната фаза се насочва от двата основни транскрипционни фактора – C/EBP α и PPAR γ . Адипогенезата, предизвикана от инсулин и инсулиноподобен растежен фактор

1 (IGF-1), се медира от PI3K/AKT сигналният път (Mandl et al., 2019). Метаболитната функция на фосфорилираната AMPK се свързва с инхибиране на адипогенните маркери и едновременно с това засилване на окисляването на мастни киселини (Jo et al., 2019). Модулирането на този механизъм е обещаващ подход за идентифициране на потенциални вещества с анти-адипогенна активност. За да се подкрепят данните от RT-qPCR анализа, е анализиран набор от протеини на няколко основни регулатора на адипогенезата (PPAR γ , AKT, AMPK, pAMPK, адипонектин, C/EBP α , PI3K).

Докинг симулацията предполага вероятно взаимодействие между ONON или MACK с PI3K, PPAR γ и AMPK на ниво протеин. От данните на имуноблот анализа е установено инхибиране на PI3K от ONON 5, 25 μ M и MACK 5, 10, 50 μ M (Фигура 11D). Понижаване на нивата на PPAR γ протеина е постигнато при третиране с ONON 25 μ M, MACK 5 и 50 μ M (Фигура 11C). Въпреки това, протеиновите нива на AMPK (Фигура 11F) при неговата активна форма pAMPK (Фигура 11G) са умерено намалени при третиране с ONON 5, 10 μ M и MACK 5, 25 μ M. В съответствие с RT-qPCR анализа, MACK 50 μ M значително е понижава количеството на C/EBP α протеина (Фигура 11B).



Фигура 11. Екстракт от *O. spinosa* (OSR), ононин (ONON) и маакияин (MACK) повлияват протеиновата експресия на ключови адипогенни регулатори. Протеиновите нива на адипонектин (A), C/EBP α (B), PPAR γ (C), PI3K (D), AKT (E), AMPK (F), pAMPK (G), нормализирани спрямо β -actin или β -tubulin. Представителни изображения на имуноблот (H). Резултатите са получени от три независими експеримента, изразени като средна стойност $\pm$ SEM, * $p < 0.05$ в сравнение с контролната група.

Нивата на адипонектин – един от маркерите за степен на узряване на адипоцитите (Moseti et al., 2016) са значително намалени при третиране с OSR 25 $\mu\text{g/mL}$, както и с ONON и MACK за всички приложени концентрации (Фигура 11A). Въпреки потвърдения ефект за инхибиране на диференциацията на адипоцитите, нивата на адипонектин трябва да се следят стриктно, тъй като има сведения, че корелират с инсулиновата чувствителност в мастната тъкан (Moseti et al., 2016).

Маакияин в най-високата приложена концентрация (50 μM) значително е редуцирал нивата на протеините на ключовите регулатори на адипогенезата PPAR γ и C/EBP α . Резултатите от имуноблота подкрепят твърдението, че MACK инхибира адипогенезата, посредством PPAR γ /C/EBP α сигналния път. Резултатите от имуноблота подкрепят предположението, че MACK инхибира адипогенезата, посредством PPAR γ /C/EBP α сигнален път.

Базирано на резултатите от анти-адипогенните тестове *ин витро*, като най-обещаващ вторичен метаболит за последващо *ин vivo* валидиране на неговия анти-обезоген ефект е избран маакиян.

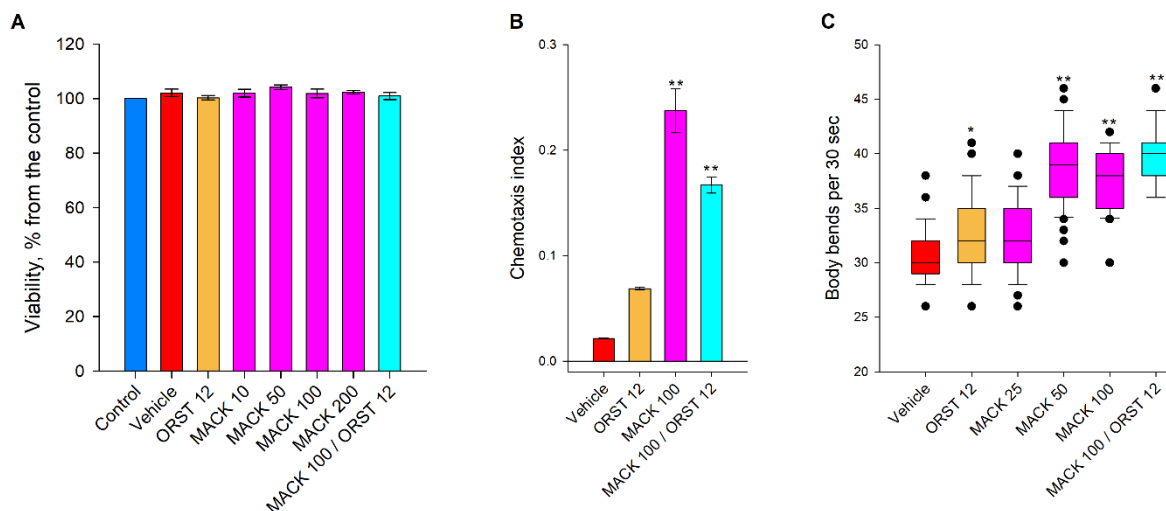
5. Валидиране на установената *ин витро* анти-адипогенна активност на маакияин при *ин vivo* модел на затлъстяване при нематоди от вида *C. elegans*

5.1. Определяне на ефекта на маакияин върху жизнеспособност и фенотипни показатели при нематоди

Липсата на промяна в жизнеността на нематодите при приложение на MACK в концентрации до 200 μM потвърждава неговата безопасност (Фигура 12A). Промяната на двигателната активност в отговор към външни стимули е необходима за реакциите на бягство, търсене на храна и други сложни поведения. В този експеримент е изследвано влиянието върху подвижността на нематоди при третиране с MACK в концентрации от 25, 50, 100 μM (Фигура 12B).

Проучванията за хемотаксис при *C. elegans* допринасят за разбирането на невронните механизми, включени в поведенческите реакции, предизвикани от сигналите на околната среда. Нематодите използват хемосензорната си система, за търсене източници на храна, за избягване на вредни вещества и за намиране на партньори. По време на експеримента с нематоди се изчислява индекса на хемотаксис, като показател за степента на привличане към MACK. Тестът е проведен с най-високата

концентрация на MACK (100 μ M, Фигура 12B), като резултатите показват, че нематодите са привлечени в най-висока степен от MACK.

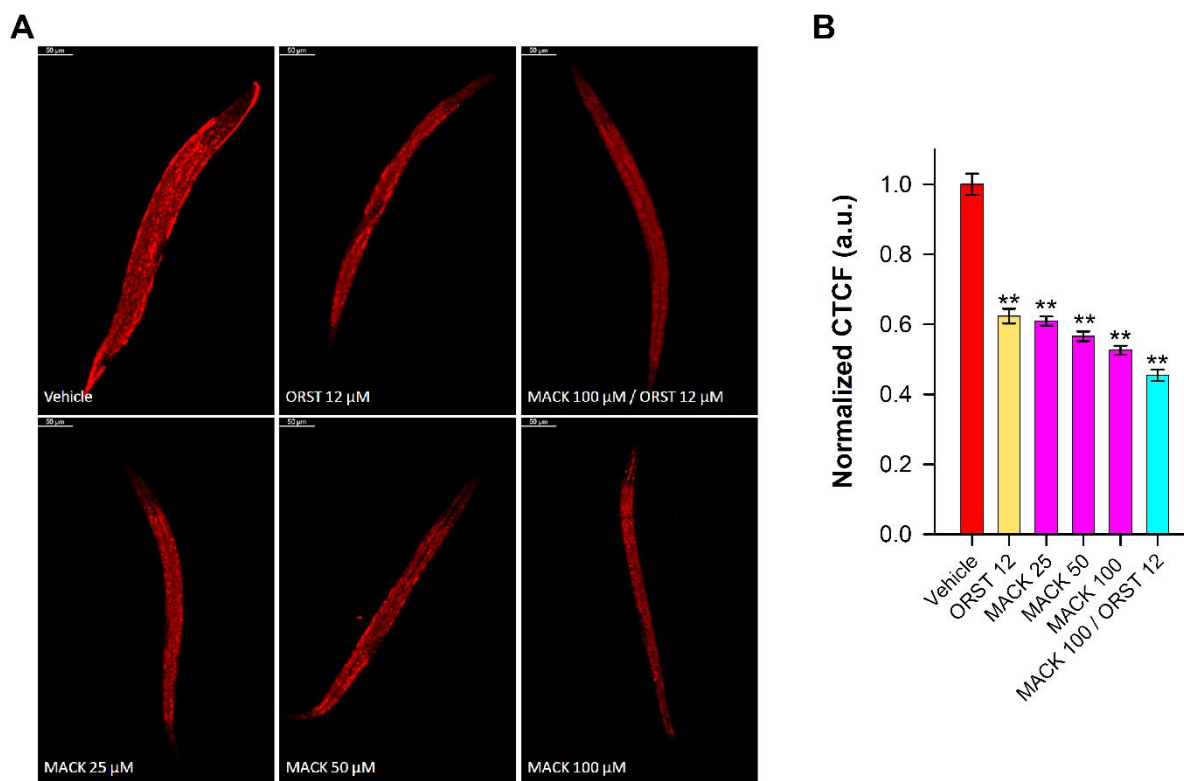


Фигура 12. Жизнеспособност и фенотипни показатели при *C. elegans*. Жизнеспособност на нематоди (A) представена като процент от контролната група след 48 часа третиране с орлистат (ORST), нарастваща концентрация на MACK и хибридна комбинация от ORST/MACK. Резултатите са показани като средна стойност $\pm$ SEM въз основа на три повторения. Статистическата значимост спрямо контролната група е представена като $p < 0.05$. Ефект на MACK (100 μ M), ORST (12 μ M) и тяхната хибридна комбинация върху индекса на хемотаксис (Chemotaxis index; B). Двигателна активност на нематоди (C), представена като брой огъвания за 30 секунди в резултат от третирането с MACK в концентрации от 25, 50, 100 μ M, ORST (12 μ M) и комбинация от ORST 12 μ M/MACK 100 μ M. Данните от три независими експеримента са представени като средно $\pm$ SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ и сравнени с групата с носител (Vehicle).

5.2. Оценка на липидното натрупване при нематоди

Промяната в натрупването на липиди при използвания ин vivo модел е отчетена чрез Nile red оцветяване, като са сравнени групите нематоди култивирани без и с глюкоза (Фигура 13).

От приготвените микроскопски препарати на всяка от групите с нематоди, са заснети конфокални флуоресцентни изображения. Резултатите показват, че третирането с MACK в концентрация от 100 μ M и комбинацията MACK 100 μ M/ORST 12 μ M в най-значителна степен понижават натрупването на липиди при нематоди в стадий L4.



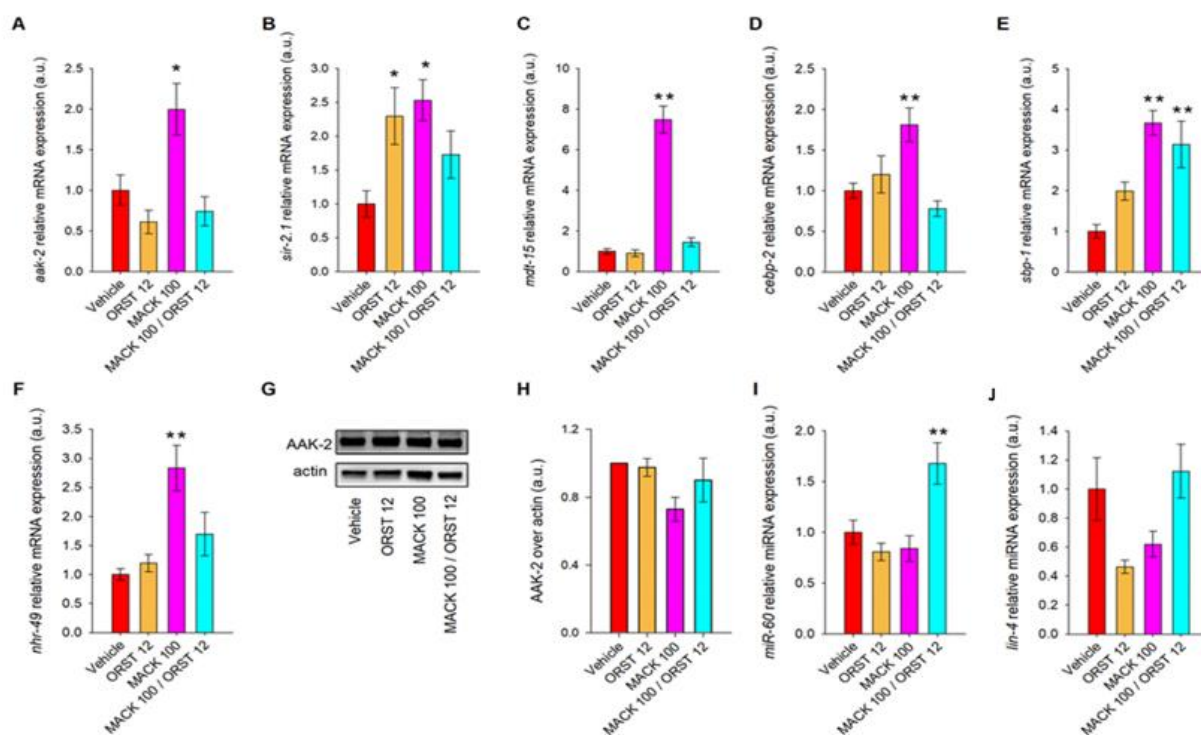
Фигура 13. Представителни конфокални флуоресцентни изображения на нематоди третирани с MACK в концентрации от 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, комбинация от MACK/ORST, орлистат 12 μ M и контрола (Vehicle; A). Количествено определяне на интензитета на флуоресценция на третирани с MACK в концентрации от 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, орлистат 12 μ M (ORST) и комбинация от MACK/ORST нематоди, нормализиран спрямо контролна група с включена глюкоза в хранителната среда и представен като коригирана обща клетъчна флуоресценция (CTCF, B). Данните са изложени като средна стойност $\pm$ SEM ** $p < 0.001$ спрямо контролната група.

5.3. Определяне на ключови за липидния метаболизъм гени при *C. elegans*

Липидният метаболизъм при *C. elegans* обхваща множество сложно регулирани процеси. В настоящата работа е изследван профила на експресия на ключови транскрипционни фактори, свързани с активирането на биосинтезата на липиди, а именно *sbp-1* и *cebp-2*. Освен това, като функционален хомолог на човешките PPAR, е определена експресията на транскрипционния фактор *nhr-49*, който подпомага два отделни аспекта на липидния метаболизъм-десатурация на мастните киселини и β -окисление (Schwartz et al., 2015; Moreno-Arriola et al., 2016; Goh et al., 2018; Nunez et al., 2023;). Оценена и относителната експресия на РНК на *aak-2*, ортолог на AMPK (Li et al., 2020; Jeong et al., 2023), както и на *sir-2.1* и *mdt-15*, за да се определи дали третирането с

MACK засяга свързаните с обмяната на хранителните вещества и енергията сигнални пътища. Известно е, че активирането на тези пътища влияе благоприятно върху липидния метаболизъм и следователно е свързано с имитирането на калорийно ограничение (Moreno-Arriola et al., 2016; Weir et al, 2017; Madeo et al., 2019).

Третирането с маакияин доведе до значително и зависимо от концентрацията понижаване на натрупването на триглицериди при хранените с глюкоза нематоди. Анализът на относителната експресия на РНК-и и микроРНК-и на нематоди, третирани с MACK (100 μ M), ORST (12 μ M) или хибридната комбинация MACK/ORST (100/12 μ M), изяснява молекулярния механизъм, участващ в отчетения анти-обезогенен ефект (Фигура 14).



Фигура 14. Определяне на относителна експресията на РНК-и, микроРНК-и и протеини на ключови гени на липидния метаболизъм при модел на затлъстяване при нематоди третирани с MACK в концентрация от 100 μ M, комбинация MACK/ORST и орлистат 12 μ M (ORST). Генна експресия на *aak-2* (A), *sir-2.1* (B), *mdt-15* (C), *cebpb-2* (D), *sbp-1* (E), *nhr-49* (F) нормализирана спрямо контролна група. Протеинови нива на фосфорилирана AAK-2 (G) нормализирани спрямо актин, експресия на микроРНК-и: *miR-60* (I) и *lin-4* (J) нормализирана спрямо групата с носител (Vehicle). Данните са представени като средна стойност $\pm$ SEM *p < 0.05, **p < 0.001 спрямо групата с носител.

Еднократното третиране с МАСК в най-високата приложена концентрация (100 μM) значително повишава *aak-2*, *sir-2.1*, *mdt-15*, *nhr-49*, *cebp-2* и *sbp-1* (Фигура 14А-Ф) в сравнение с носителя. Третирането с орлистат предизвиква значителна регулация на *sir-2.1* (Фигура 14В), докато хибридната му комбинация с МАСК повишава относителната експресия на *sbp-1* (Фигура 14Е). Установената промяна в относителната експресия на избрани участници в липидния метаболизъм, като *aak-2* и *sir-2.1* при нематоди показва, че МАСК активира сигналните пътища, участващи в окислението на мастните киселини, митохондриалната биогенеза и разхода на енергия, които са тясно свързани с калорийното ограничение.

Активирането на ААК-2/АМРК при *C. elegans* се свързва със зависимото от хранителната рестрикция удължаване на живота чрез ремоделиране на митохондриалната функция в периферните тъкани, увеличава разхода на енергия и насърчава здравословното стареене (Schwartz et al., 2015; Weir et al., 2017; Zhang et al., 2019; Jeong et al., 2023). Наблюдаваното транскрипционно активиране на *aak-2* при третиране с МАСК потвърди необходимостта да се анализират нивата на фосфорилиране на АМРК при Thr172, място свързано с повишена активност, при индуцирания с глюкоза модел на *C. elegans* (Фигура 14Г,Н). Имуноблот анализа в избраната времева точка не показва променено фосфорилиране на ААК-2 нито при МАСК, нито при комбинацията МАСК/ORST.

Последващата оценка на относителната експресия на микроРНК е използвана, за да се получи по-широка картина за регулирането на генната експресия при експерименталното третиране на *C. elegans*, подхранвани с глюкоза. Последните проучвания се фокусират върху изследването на потенциала на природните вещества за модулиране на микроРНК-и, свързани с рака, които също биха могли да бъдат свързани с изучаване на затлъстяването (Chen et al., 2005; Kato et al., 2016; Shamsuzzama et al., 2017; Zhang et al., 2020; Brosnan et al., 2021). По-специално, няколко микроРНК-и като *mir-60* и *lin-4* при *C. elegans* са свързани с липидния метаболизъм и стареенето. Освен това *mir-60* се експресира изключително в червата на нематодите, като оказва влияние върху отговора им към оксидативен стрес, усвояването на хранителните вещества и възстановяването след лишаване от храна (Kato et al., 2016; Zhang et al., 2020; Brosnan et al., 2021).

Резултатите от RT-qPCR показват, че само третирането с хибридната комбинация МАСК/ORST (100/12 μM) води до повишаване на експресията на *miR-60* (Фигура 14I). Интересно е, че по-ранни проучвания са установили връзка между понижаването на *miR-*

60 и намаляването на липидите (Brosnan et al., 2021). Въпреки това нашите открития предполагат, че повишената експресия на тази микроРНК-а може също да играе роля в механизмите на липидния метаболизъм. В нашето изследване *lin-4* не е засегнат при всички експериментални третираня (Фигура 14J). Следователно е основателно да се предположи, че ефекта на хибридната комбинация върху липидите вероятно не е свързан с *lin-4*.

V. ДИСКУСИЯ

1. Сигналния път PI3K/АКТ е ключов за анти-адипогенния ефект на *A. monticola* и нейните вторични метаболити

Развитието на затлъстяването корелира с регулирането на телесния метаболизъм чрез функцията на мастната тъкан. Следователно е от голямо значение да се идентифицират биоактивни вещества, чийто ефект е насочен към функцията на адипоцитите, за да се предотврати и контролира това сложно метаболитно заболяване.

Сигналният път PI3K/АКТ в адипоцитите е отговорен за иницирането на диференциация и липидния биосинтез. Един от основните субстрати за свързания с АКТ липиден метаболизъм е SREBP-1, който регулира синтеза на мастните киселини и гените, свързани с холестерола (Huang et al., 2018). След като преадипоцитите се включат в процеса на адипогенна трансформация, експресията на PPAR γ и C/EBP α активира транскрипционна каскада, която дава начало на експресията на гени, като SREBP-1, ACC, FASN, адипонектин, сочени като адипоцитни маркери (Mandl et al., 2019; Vasileva et al., 2021).

Ефекта на флавоноидите при диабет и затлъстяване се постигат чрез модулация на ключови сигнални пътища, като по този начин се подобрява метаболизма и транспорта на глюкоза в β -клетките на панкреаса, хепатоцитите, адипоцитите и скелетни миофибрили (Goto et al., 2012; Hur et al., 2020; Wu et al., 2020). Метаболитното профилиране, базирано на ЯМР спектроскопия, идентифицира екстракта на ALM като източник на различни флавоноиди и флавоноидни гликозиди, като AST и QUE. Няколко предишни проучвания съобщават, че AST регулира липогенезата и натрупването на мазнини в 3T3-L1 адипоцити чрез потискане на експресията на информационна РНК на PPAR γ , C/EBP α , FASN и лептин (Swamy et al., 2020; Wu et al., 2020). По същия начин ALM демонстрира значителен ефект срещу натрупването на мазнини в черния дроб и понижаване на възпалителните маркери при различни модели на чернодробно увреждане (Roman Junior et al., 2015; Hur et al., 2020).

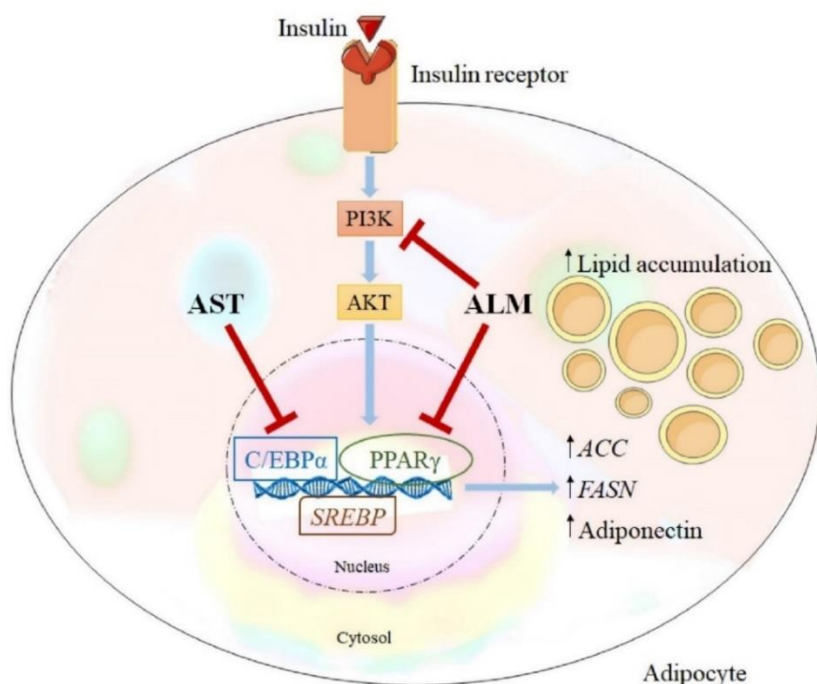
В хода на настоящия експеримент е разкрито, че екстрактът от ALM може да инхибира диференциацията и натрупването на липиди в човешки адипоцити, а неговите активни компоненти AST и QUE участват поне частично в наблюдавания анти-адипогенен ефект. Екстрактът от ALM намалява експресията на различни гени и протеини, свързани с адипогенезата, и инхибира диференциацията на човешките преадипоцити. Екстракта от ALM потиска медираните от PI3K/АКТ сигнални каскади, които предизвикват пролиферация на преадипоцити, този ефект може да се дължи на

инхибирането на INSR киназа чрез директно свързване на AST или друго съединение на ALM с активната PI3K. Протеиновите нива на PI3K и AKT са намалени в зависимост от концентрацията на третерането с ALM. Въпреки това, в съответствие с докинг симулацията, тестовете показват, че чистият AST има двупосочни ефекти върху сигналния път PI3K/AKT. Това показва, че AST може да има ефект на двупосочно регулиране върху сигналния път PI3K/AKT за човешките мастни клетки, като критичната концентрация на тази двупосочна регулация е между 10-25 μM . По същия начин анти-адипогенният ефект на какаовите полифеноли в адипоцити на плъхове и мишки на диета предизвикваща затлъстяване, е потвърден в предишно проучване (Min et al., 2013). Авторите са предоставили доказателства, че какаовите полифеноли директно инхибират INSR и впоследствие потискат както ERK-, така и PI3K/AKT-медиирани сигнални каскади (Min et al., 2013).

Инсулиновата сигнализация има критична роля за съхранението на липидите в мастната тъкан, както и за хомеостазата на глюкозата. В присъствието на инсулин, INSR автофосфорилира и в следствие фосфорилира семейството на IRS, което резултира в активиране на два основни сигнални пътя, Ras/MAPK и PI3K/AKT (Huang et al., 2018; Li et al., 2020b). Активирането на IRS-1 насърчава фосфорилирането на AKT, като активирането е чрез свързване между регулаторната субединица на PI3K и фосфотирозиновите остатъци на IRS-1. Последващо сигналният път PI3K/AKT участва в инициирането на диференциация чрез сложни сигнални каскади (Ortega-Molina et al., 2015; Huang et al., 2018). Следователно, инхибиторация ефект на ALM върху активността на PI3K и нейните сигнални пътища (PI3K/AKT) надолу по веригата изглежда медира този анти-адипогенен ефект. Едновременно с това PI3K/AKT пътят е отговорен и за широк спектър от метаболитни функции в други тъкани (Huang et al., 2018; Xu et al., 2020). Блокирането на активността на INSR трябва да се използва при внимателно обмисляне, тъй като това може да доведе до вредни последици, като развитие на инсулинова резистентност. Предишни проучвания демонстрират, че активността на INSR е нарушена в скелетните мускули на хора със затлъстяване и диабет, специфични мишки с чернодробен INSR нокдаун показват тежка инсулинова резистентност и непоносимост към глюкоза (Min et al., 2013; Li et al., 2020b; Xu et al., 2020). В тази връзка чистият AST, който действа като PI3K инхибитор, също може да предизвика инсулинова резистентност. Въпреки, че активирането на INSR от инсулин е основен индуктор на адипогенезата, инсулиноподобният растежен фактор (IGF)-1 и IGF-1 рецепторът (IGF1R) са други критични фактори за инициране на инсулиновата

сигнализация чрез активиране на PI3K/AKT-медиирани сигнални каскади (Huang et al., 2018). Вероятно е AST, QUE или други компоненти на ALM взаимодействат с IGF1R, което води до инхибиране на адипогенезата, без да се намалява действието на инсулина. Необходими са допълнителни проучвания, за да се изследва дали екстрактът от ALM или неговите чисти вещества предпазват от инсулинова резистентност чрез повишаване на активността на IGF1R или оказва пряк инхибиторен ефект върху INSR. Въпреки това по време на експеримента не се стигна до определяне дали ALM или AST подобряват инсулиновата резистентност, поради факта, че е използвана *in vitro* моделна система. Друго възможно обяснение може да бъде, че потискането на PI3K/AKT сигнализирането, наблюдавано при ALM и третиране с чистото вещество AST е тъканно специфично, поради което потенциалният ефект върху инсулиновата чувствителност може да се различава при различните видове клетки.

Транскрипционните фактори PPAR γ и C/EBP α се експресират непрекъснато в зрели адипоцити (Aprile et al., 2018; Vasileva et al., 2021). В допълнение към модулацията на PI3K/AKT сигнализирането, ALM и неговите чисти компоненти са инхибирали и диференциацията на адипоцитите, изразяващо се чрез намаляване на експресията на PPAR γ и C/EBP α както на генни, така и на протеинови нива. Взаимодействието на AST и на QUE с PPAR γ и/или C/EBP α е прогнозирано чрез *in silico* симулация и допълнително потвърдено от анализа на генната и протеиновата експреси.



Фигура 15. Предложен механизъм на действие на екстракта от цариче (ALM) и астрагалин (AST). Третирането с ALM понижи нивата на PPAR γ и C/EBP α при човешки

адипоцити, което е свързано с инхибирането на сигналния път PI3K/AKT. При третирането с AST анти-адипогенния ефект се медира посредством директно взаимодействие с PPAR γ и C/EBP α .

Настоящата експериментална работа предоставя теоретична основа за анти-адипогенния ефект на ALM, медиран чрез модулация в сигналния път PI3K/AKT и нивата на PPAR γ протеина. Идентифицираните чисти вещества AST и QUE демонстрират потенциал за анти-адипогенно действие чрез модулация на различни сигнални пътища. За да се определят допълнително тези потенциално фармакологични ефекти на екстракта от ALM и неговите чисти компоненти, трябва да се извършат проучвания върху други клетъчни типове и модели на затлъстяване *ин виво*.

Нещо повече, настоящото проучване предостави доказателства, че ALM инхибира ранния етап на адипогенезата в човешките адипоцити чрез инхибиране на активността на PI3K, посредством директно свързване. В допълнение, ALM проявява анти-адипогенна активност изразяваща се в намаляване на вътреклетъчните липиди и засилената липолиза. Променени PPAR γ , C/EBP α и адипонектин, наблюдавани при третиране с ALM при човешки адипоцити, могат да бъдат свързани с инхибирането на сигналния път PI3K/AKT. Също така е установено, че двете чисти вещества AST и QUE се намесват в изследваните адипогенни пътища в различна степен (Фигура 15). Като цяло тези констатации предполагат потенциал на ALM за предотвратяване на затлъстяването, което изисква допълнително *ин виво* валидиране. Може да се отбележи, че идентифицираният фитохимичен състав на ALM е многообещаващ като източник на нови биологично активни вещества, насочени към контролиране на затлъстяването.

2. Анти-адипогенната активност на ононин и маакияин в човешки адипоцити се медира чрез инхибиране на PPAR γ

Адипогенезата като прецизно регулиран процес може да бъде повлияна чрез модулиране на ангажираните в него сигнални молекули. Адипоцитната диференциация се индуцира от инсулин и IGF-1. Освен това, инсулиновата сигнализация се медира чрез активиране на PI3K/AKT и на RAS/MAPK пътя (Mandl et al., 2019). След инициране, адипогенезата се управлява от експресия на C/EBP β и C/EBP δ по време на ранната адипогенна фаза, последвано от повишаване на PPAR γ и C/EBP α и насърчаване на липогенеза (Tang et al., 2021). Голямо значение за липидната биогенеза имат липогенения транскрипционен фактор SREBP-1 и неговите целеви гени ACC и FASN (кодиращи ключови ензими, Bertolio et al., 2019). Чрез настоящия експеримент е потвърдено, че избраните вторични

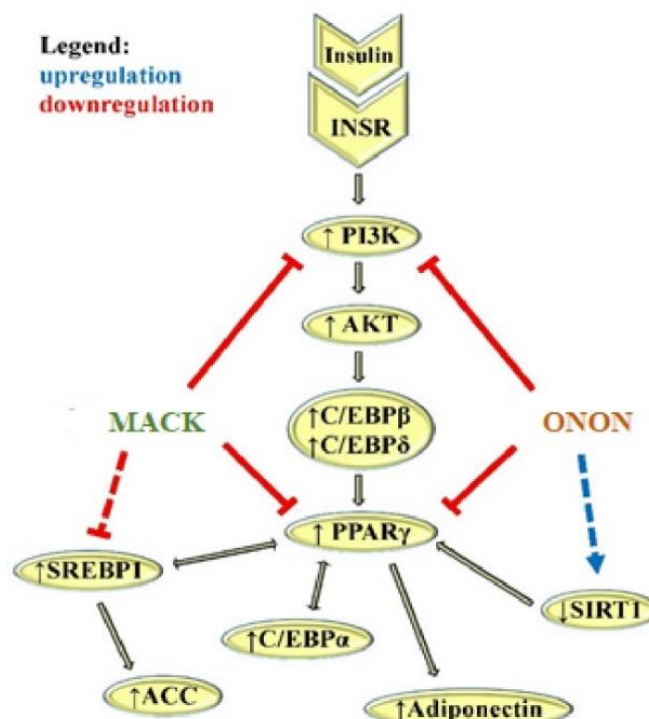
метаболити от OSR, ONON и MACK, инхибират процеса на адипогенна диференциация на човешки адипоцити. Получените резултати предполагат умерено влияние върху ранната фаза на адипогенната диференциация при третиране с OSR. Въпреки отчетеното умереното увеличение на натрупаните липиди, наблюдавано при Oil red O анализа, нито профилът на генна експресия, нито броя на копията на протеиновите молекули в клетката на изследваните късни адипогенни маркери са повлияни значително от прилагането на OSR, изключвайки това на адипонектин при прилагане на концентрация 25 µg/mL.

Молекулярно взаимодействие между PI3K и PPAR γ и двете чисти вещества е предсказано със силен афинитет чрез докинг изчисленията и допълнително потвърдено от резултатите от имуноблота. Получените резултати позволяват допускането на хипотезата, че потискането на PI3K от ONON и MACK води до промени в нивата на експресия на информационна РНК на ранните адипогенни маркери, като C/EBP β и C/EBP δ . Маакияинът значително инхибира адипогенезата и липогенезата посредством понижаване на експресията на SREBP1 и ACC гени. Също така, MACK е понижил нивата на PI3K протеина считан за медиатор на адипогенната трансформация и е инхибирал експресията на протеините на късните адипогенно-специфични транскрипционни фактори като PPAR γ , C/EBP α както и на адипонектин в човешки адипоцити. По сходен механизъм ONON е проявил своя анти-адипогенен ефект, чрез понижаване на нивата на PI3K протеина с повишаване експресията на SIRT1 и последващо инхибиране на PPAR γ и адипонектин. Двата вторични метаболита (ONON и MACK) са инхибирали PI3K което предполага, че чистите вещества повлияват ранните етапи на адипогенната диференциация. Адипогенезата е инхибирана от MACK чрез PPAR γ /C/EBP α сигнализирането, а липогенезата е повлияна негативно чрез понижаване на SREBP1 и неговите липогенни гени. За разлика от MACK, ONON е проявил анти-адипогенен ефект единствено чрез повишаване на SIRT1 и инхибиране на PPAR γ . В допълнение, ONON и MACK са намалили нивата на адипонектин, което в крайна сметка може да бъде вторичен ефект на PPAR γ модулацията.

Инхибирането на диференциацията на адипоцитите и модулирането на липолизата са възможни молекулярни механизми при лечението на затлъстяването и свързаните с него усложнения (Santos et al., 2021). Терминалната диференциация на адипоцитите се управлява от PPAR γ и C/EBP α , докато SREBP-1 е отговорен за контрола на липогенезата. Също така транскрипционната активност на PPAR γ , заедно с адипогенезата, могат да бъдат негативно повлияни от активиране на SIRT1. В

допълнение, успешно намаляване на излишната мастна тъкан се наблюдава при инхибиране на PI3K/AKT сигналния път (Foukas et al., 2013; Jeffery et al., 2015; Ortega-Molina et al., 2015; Nagai et al., 2018), което разкрива друга подходяща мишена за лечение на затлъстяване.

Екстрактът от корени на *O. spinosa* има в изобилие различни класове вторични метаболити (Abdесселем et al., 2016; Addotey et al., 2018). Базирано на данни от етнофармакологична употреба на екстракт от OSR за лечение на метаболитни нарушения, включително затлъстяване, и липсата на научни доказателства, свързани с ефекта на OSR върху адипогенезата, е изследван за първи път анти-адипогенния потенциал на OSR в ин витро модел на затлъстяване на човешки адипоцити. Чрез анализ на протонните ЯМР спектри на OSR в съответствие с литературните данни е установено наличието на ононин, сативанон, оногенин, спинонин и маакияин като вторични метаболити (Gampe et al., 2016; Addotey et al., 2018). Допълнителният анализ на 2D ЯМР спектрите на растителния екстракт потвърди наличието на ONON и MACK и те са избрани за последващите биологични експерименти заедно с OSR. Схема на предложени анти-адипогенен механизъм на екстракт от корени на *O. spinosa*, ONON и MACK (Фигура 16).



Фигура 16. Каскада на адипогенна диференциация и предложени механизми на анти-адипогенни и/или антилипогенни ефекти на ONON (ононин) и MACK (маакияин), идентифицирани в екстракт от корен на *Ononis spinosa* L. Двете вещества ONON и

MAKK инхибират PI3K, като медиатор на инсулиновата сигнализация чрез INSR и индуцира диференциацията, което води до последващи промени в експресията на C/EBP β и δ . В допълнение, ONON активира SIRT1, който е инхибитор на ключовия за терминална адипогенна диференциация транскрипционен фактор PPAR γ , както и потиска късния адипогенен маркер-адипонектин. Повлияването на адипогенезата от MAKK е чрез негативно регулиране на PPAR γ и C/EBP α сигнализирането, както и това на адипонектин. Последващо е наблюдавано потискане на липогенезата, медирана от SREBP-1 и неговия целеви ензим ACC.

Интерес буди и факта, че OSR значително стимулира адипогенезата, представена чрез липидно оцветяване, и намалява липидна хидролиза, измерена чрез освободения глицерол в културалната среда. Освен това, при резултатите от анализите на относителната информационна RNA и експресията на протеини показва умерено намаляване на адипонектин при OSR третиране само в най-високата приложена концентрация. Тези открития предполагат, че OSR не е насочен директно към молекулярните регулаторни пътища на адипогенната диференциация, тествани в нашата експериментална работа. Неговият видим ефект за подобряване на метаболитните нарушения вероятно включва други молекулярни пътища или органи и тъкани, различни от мастното депо, което налага да бъде изяснено в ин виво модел. Въпреки това е видно, че както ONON, така и MAKK предизвикват понижаване на скоростта на диференциация на човешките адипоцити, което е в подкрепа на твърдението, че OSR е възможен източник на естествени биоактивни вещества срещу затлъстяване.

Изофлавоновият гликозид ONON се открива в много растения като *Smilax scobinicaulis* C.H.Wright, *Millettia nitida* Benth. и видове *Ononis* (Gampe et al., 2016; 2018; Dong et al., 2017; Addotey et al., 2018; Yu et al., 2019; Chen et al., 2021; Gong et al., 2021). Въпреки, че литературните данни са незначителни по отношение на неговата биологична активност, се съобщава за противовъзпалителен, антиангиогенен и антивирусен потенциал (Chen et al., 2012; Dong et al., 2017; Gong et al., 2021). Следва да поясним, че ONON не е изследван за анти-адипогенен ефект досега, но е съобщено, че неговата агликонова част (формононетин) инхибира адипогенезата чрез AMPK/ β -катенин сигналният път в ин виво (миши) модел на затлъстяване (Gautam et al., 2017). По същия начин, в нашето проучване, диференциацията на адипоцитите заедно с липолизата са значително намалени в присъствието на ONON. Чрез *in silico* метод е предвидено възможното взаимодействие между ONON и изследваните протеинови мишени като AMPK, PI3K, PPAR γ , C/EBP α и АКТ. Наблюдава се понижено количество

на PI3K и PPAR γ протеини чрез имуноблот анализ, като резултат от третиране с ONON. Инхибирането на PI3K от ONON може да бъде причината за промените на транскрипционните фактори на ранната фаза C/EBP β и δ . По отношение на нивото на AMPK протеина, получените резултати са в съответствие с тези на Gautam et al. (2017), тъй като тяхното проучване съобщава за липса на каквато и да е промяна в нивото на общия протеин на AMPK по време на 9-ия ден от диференциацията в миши 3T3-L1 адипоцити. Въпреки това, в контраст с този доклад не е открито увеличение на фосфорилирането на AMPK. Едно много вероятно обяснение е, че формононетинът може да има по-голям афинитет към AMPK, отколкото ONON. Също така може да се окаже, че в човешките адипоцити активирането на pAMPK настъпва преди 9-ия ден, следователно остава неоткрито в хода на настоящата експериментална постановка. Повишената регулация на SIRT1 предпазва от метаболитни увреждания чрез взаимодействие с PPAR γ (Perrini et al., 2019) и/или AMPK (Yao et al., 2018; Lee et al., 2019; Song et al., 2019; Liou et al., 2020). Освен това, регулирането на SIRT1 е свързано с понижена адипогенеза заедно с повишена остеогенеза (Song et al., 2019). Открития в това проучване са в подкрепа на твърдението, че ONON регулира SIRT1 независимо от активирането на AMPK, което може да бъде от решаващо значение за наблюдавания анти-адипогенен ефект на ONON. Като цяло, анти-обезогенния ефект на ONON вероятно е медиран от инхибиране на PI3K и насърчаване на регулирането на SIRT1 с последващо понижаване на нивата на PPAR γ и адипонектин.

Маакияин е птерокарпан, за който се съобщава, че притежава антиалергична, противоракова, противовъзпалителна и антимикробна активност, както и инхибира моноамин оксидаза B (Nariai et al., 2015; Liu et al., 2020; Tsai et al., 2020). В допълнение, MACK инхибира диференциацията и костно-резорбиращите функции на миши остеокласти чрез потискане на NF- κ B сигналния път (Liu et al., 2020). Като се имат предвид механистичните взаимовръзки между адипогенезата и остеогенезата (Muruganandan et al., 2020), инхибирането на костната резорбция от MACK може да има общи молекулярни мишени с анти-адипогенния механизъм в адипоцитите. В хода на нашето проучване е наблюдавано независимо от концентрацията понижаване на натрупването на липидите и хидролизата на триглицеридите при третиране с MACK. Същия модулира експресията на главните адипогенни транскрипционни фактори като CEBPA, CEBPB, CEBPD и SERBP1 и гена на липогенния ензим ACC. В допълнение, MACK значително е повишил генната експресия на AMPK. В подкрепа на симулираните взаимодействия от докинга, същите взаимодействия между целеви протеини и MACK

са потвърдени чрез имуноблот техника, като е отчетено значително понижаване на PI3K, PPAR γ , C/EBP α и адипонектин. Изключение прави третирането с MACK при което не са открити промени нито в общия AMPK, нито във фосфорилираната форма. Въпреки това, силният афинитет на свързване, предположен от резултатите от докинга и зависимото от концентрацията транскрипционно активиране на този ген предполагат, че MACK заслужава по нататъшно изследване като AMPK модулатор. Подобно на предложеното обяснение за ефекта на ONON върху активността на AMPK, възможно е и MACK да влияе върху фосфорилиране в различна времева точка на адипогенна трансформация в човешки адипоцити. Получените данни сочат, че MACK ограничава натрупването на липиди чрез намаляване на липогенезата посредством потискане на SREBP-1 и ACC, както и инхибира адипогенно-специфичните транскрипционни фактори PPAR γ и C/EBP α в човешки адипоцити.

В обобщение на резултатите от експериментите може да заключим, че OSR не повлиява значимо адипогенезата, докато MACK и ONON намаляват значително натрупването на липиди. Инхибиращия ефект на MACK и ONON върху натрупването на липиди е докладвано за първи път в експеримент с човешки адипоцити. Най-вероятният механизъм на действие на ONON е чрез потискане на PI3K, активиране на SIRT1 и последващо инхибиране на активността на оста PPAR γ /адипонектин. Значителната анти-адипогенна активност на MACK е медирана чрез модулиране на PI3K и PPAR γ /C/EBP α сигнализиране и ограничаване на липогенезата чрез инхибиране на SREBP-1 и ACC. Двете вещества притежават значителен анти-адипогенен ефект, който заслужава *ин vivo* валидиране.

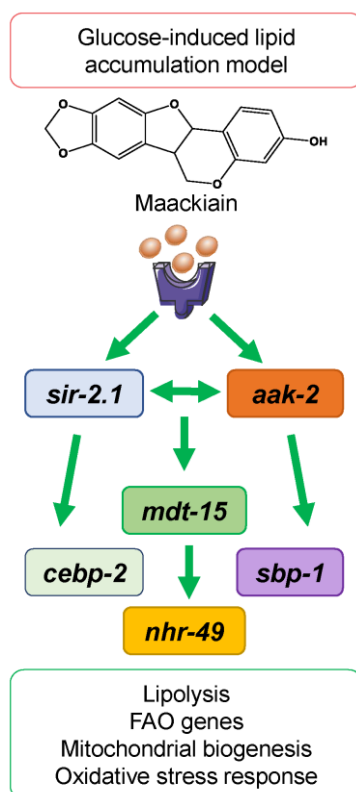
Като заключение на горе изложеното, единствено MACK от всички вторични метаболити обект на това проучване е намалил натрупването на липиди зависимо от концентрацията. В допълнение, той е модулирал експресията на главните адипогенни транскрипционни фактори като CEBPA, CEBPB, CEBPD и SERBP1 и гена на липогенния ензим ACC. Значително понижаване на PI3K, PPAR γ , C/EBP α и адипонектин е потвърдено на ниво протеини.

На база на многообещаващите резултатите от проведените тестове, комплексното му действие и факта, че за първи път се превеждат доказателства за потенциала на MACK да инхибира адипогенезата, той е избран за последващото *ин vivo* валидиране на резултатите от SGBS модела.

3. Маакияин проявява анти-обезогенна активност посредством *aak-2*-медирано намаляване на липидите при *C. elegans*

Наличието на разнообразие от клетъчни, молекулярни, генетични и поведенчески анализи и сходството на ключови пътища за регулиране на липидната обмяна, еволюционно запазени между нематодите и хората, насърчават използването на този модел като инструмент за изследване на затлъстяването (Dyczkowska et al., 2021).

Базирано на резултатите, получени от третирането с МАСК в предизвикано от глюкозата натрупване на липиди при *C. elegans*, се предлага молекулярния механизъм представен на Фигура 17. При използвания моделен организъм се наблюдава тенденция на свръхекспресия на информационна РНК на *cebp-2* и *sbp-1*. Регулирането на *sir-2.1* при нематоди свидетелства за потенциално съвместно взаимодействие с *aak-2*, и дефинира техния ефект за намаляване на липидите по механизъм имитиращ калорийно ограничение. Хомологът на PPARs, *nhr-49* се регулира положително в настоящия експеримент с нематоди при третиране с МАСК, което се асоциира с *aak-2/sir-2.1*-зависим енергиен разход.



Фигура 17. Механизъм на действие на маакияин при модел на затлъстяване на нематоди. Ефекта на маакияин върху липидния метаболизъм, наподобява на този, предизвикан от някои миметици на калорийната рестрикция. Механистично, маакияинът въздейства на

основните сензорни регулатори от мрежата за сигнализиране на хранителни вещества и енергия, като *aak-2*, *sirt-2.1*, *nhr-49*, *cebp-2* и *sbp-1*.

По отношение на MACK се споменава експеримент за оценка на неговия потенциал за облекчаване на симптоми на болестта на Паркинсон в модел на *C. elegans* (Tsai et al., 2020). В отговор на ограничаване на приема на калории се инициират сложни молекулярни механизми (Madeo et al., 2019). Тези сложни пътища показват висока степен на еволюционно опазване на различни видове. Въпреки, че степента на генетична хомология между хората и *C. elegans* е по-ниска от тази между хора и гризачи, нематодите представляват физиологично подходящ моделен организъм за изследване на липидите метаболизъм поради техния напълно секвениран геном (Weir et al., 2017). Например, *C. elegans* е признат модел за изучаване на ролята на AMPK и сиртуините в регулирането на клетъчните функции и техните връзки с дълголетието и удължаването на живота заедно с ролята им в липидите метаболизъм (Guo et al., 2014; Farias-Pereira et al., 2019; Zhang et al., 2019). Подобно на MACK, други биоактивни молекули, като кафеената киселина, куркумин и галова киселина са показали ефект върху смекчаване на натрупването на мазнини чрез модулиране на калорийното ограничение (Ma et al., 2015; Bakar et al., 2020; Yue et al., 2021). В центъра на този механизъм на действие е AMPK/AAK-2, който е регулиран по подобен начин и при третирането с маакийн. Неоткритото фосфорилиране на AMPK/AAK-2 в настоящия експеримент може да бъде поради различна времева точка на пика на фосфорилиране, която се отчита за различните активатори (Moreno-Arriola et al., 2016; Nunez et al., 2023). Освен това, съответствието между резултатите в промяната на двигателната активност и липидното оцветяване предполагат увеличен разход на енергия, фактор, който често се свързва с повишена автофагия, регулирано сигнализиране на хранителни вещества и намален оксидативен стрес (Sun et al., 2018). Наблюдавания ефект може също да повлияе и на невроендокринната мрежа, особено като се има предвид, че MACK, както самостоятелно, така и в комбинация с ORST, служи като атрактант за нематодите. Напоследък подходът за комбиниране на одобрени лекарствени вещества с биоактивни съединения от естествен произход, започна да се проучва задълбочено. Този подход има за цел да произведе допълнителни фармакологични ефекти, като например при сенолитична комбинация дазатиниб и кверцетин, който е в процес на клинична оценка за мускулно-скелетни нарушения (Taguchi et al., 2020; Novais et al., 2021; Islam et al., 2023). Интерес буди факта, че данни от третирането с хибридна комбинация между MACK/ORST показат превъзходен ефект по отношение на натрупване на липиди в

сравнение с прилагането на всяко от съединенията самостоятелно. Въпреки това, резултатите от анализите на генната експресия сочат, че комбинираното третиране с MACK/ORST не води до синергично взаимодействие. Положителна модулация се наблюдава единствено за експресията на *sbp-1* и *mir-60*. Липсата на промени в експресията на *lin-4* по-скоро изключва връзка между тази микроРНК-а и липидоредуциращия ефект на MACK. Конкурентното взаимодействие между референтното лекарство против затлъстяване ORST и естественото съединение MACK, което включва припокриващ се молекулярен механизъм, е едно от възможните обяснения на наблюдаваното потискане на генната експресия на третираните нематоди с хибридна комбинация. Съответно, нашите резултати показват, че както MACK, така и ORST повишава експресията на *sir-2.1*, докато този ефект бива понижен при тяхната комбинация.

Следователно можем да спекулираме, че и двете съединения се конкурират за тяхното взаимодействие за регулация на *sir-2.1*. Резултатите потвърждават, че прилагането на MACK, както и неговата хибридна комбинация с ORST, повишават разхода на енергия в базирания на *C. elegans* модел на затлъстяване и допринася за намалено натрупване на липиди и при двете третираня. Детайлен преглед на включените сигнални пътища разкрива различни молекулярни реакции. Третирането с MACK повишава ключовите транскрипционни фактори и ко-активатори, които са неразделна част от разхода на енергия и митохондриалната активност (*aak-2*, *sir-2.1*, *mdt-15*, и *nhr-49*) както и на липидната биосинтеза (*cebp-2* и *sbp-1*). От друга страна, хибридна комбинация на MACK/ORST основно повишава експресията на *sbp-1* и *mir-60*. Резултатите от *in vivo* експеримента не само потвърждават анти-обезогенните свойства на естествения птерокарпан-маакияин, нещо повече демонстрират превъзходен ефект на маакияина сравнено с контролното лекарство-орлистат. Отчетена е повишена подвижност на групата третирана с MACK, което е показател за увеличен енергиен разход, повлияващ натрупването на мазнини в нематодите. Механистично, третирането с MACK активира молекулярните сигнални пътища, свързани с калориината рестрикция, *aak-2/sir2.1*, и разход на енергия и липиден метаболизъм, *nhr-49/mdt-15*. Тези открития осигуряват обосновка за по-нататъшно изследване на механизмите, които са в основата на анти-обезогенното действие на MACK и потенциалното му използване като естествено съединение с капацитет за имитиране на калорийно ограничение.

VI. ИЗВОДИ

1. Установена е значима анти-адипогенна активност на екстракт от цариче чрез повлияване на PI3K/AKT сигналния път при човешки адипоцити.
2. Кверцитрин значително потиска натрупването на липиди, като липолизата е умерено инхибирана.
3. Анти-обезогенната активност на екстракт от гръмотрън се дължи на индиректно повлияване на молекулярните пътища отговорни за адипогенната диференциация.
4. Ононин проявява анти-адипогенна активност чрез регулиране на SIRT1 и инхибиране на PPAR γ .
5. Маакияин инхибира адипогенезата чрез PPAR γ сигнализиране и потиска липогенезата чрез регулиране надолу на SREBP1 и регулираните от него липогенни гени.
6. Потенциала на маакияин да инхибира липидния метаболизъм е потвърден за първи път на организмово ниво при *C. elegans*.

VII. ПРИНОСИ

С научно-фундаментален характер:

1. Разкрит е потенциала на екстрактът от *Alchemilla monticola* Opiz да инхибира диференциацията и натрупването на липиди в човешки адипоцити, както и ролята на неговите активни компоненти астрагалин и кверцитрин.
2. Определен е ефекта на екстракт от *A. monticola* да потиска ранния етап на адипогенезата в човешките адипоцити чрез инхибиране на активността на PI3K.
3. Дефиниран е модулирания сигнален път отговорен за наблюдавания антиадипоген ефект на екстракт от цариче, а именно PI3K/АКТ и нивата на PPAR γ протеина.
4. Установен е двупосочния ефект на астрагалин за регулиране на сигналния път PI3K/АКТ при човешките мастни клетки, като критичната концентрация на тази двупосочна регулация е между 10-25 μ M.
5. Доказан е потенциала на маакияин да инхибира адипогенезата чрез PPAR γ /C/EBP α сигнализирането, и липогенезата чрез понижаване на SREBP1 и неговите липогенни гени.
6. Предложен е механизъм на действие за анти-адипогенен ефект на ононин включващ повишаване на SIRT1 и инхибиране на PPAR γ .
7. Определен е потенциала на маакияин да активира молекулярните сигнални пътища, свързани с калориината рестрикция, *aak-2/sir2.1*, и разхода на енергия и липиден метаболизъм, *nhr-49/mdt-15* в *in vivo* модел.

С научно-приложен характер:

Получените данни дават основание да предположим, че маакияин би могъл да се използва, като естествено съединение с капацитет за имитиране на калорийно ограничение.

Благодарности

Бих искала да изкажа своята искрена благодарност към:

- ❖ Проф. д-р Милен И. Георгиев-научен ръководител, за проявеното доверие, за съветите при осъществяването на експерименталната работа и интерпретирането на резултатите, както и за дискусиите по време на оформянето на дисертационния труд.
- ❖ Всички колеги от колектива на лаборатория Метаболомика към Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ при БАН, гр. Пловдив и Център по растителна и системна биология и биотехнология, гр. Пловдив за съдействието при изпълнение на анализите, обработката на резултатите, дискусиите по отношение на получените данни и за огромната подкрепа и всеотдайност при реализирането на дисертацията.
- ❖ Ръководството на Института по микробиология “Стефан Ангелов” за институционалната подкрепа.
- ❖ Цялото ми семейство и приятели за огромната подкрепа.

Научните изследвания, включени в настоящия дисертационен труд са осъществени с финансовата подкрепа на проект PlantaSYST (SGA No 739582 и FPA No. 664620) по програма „Хоризонт 2020“ на Европейския Съюз, и проект BG05M2OP001-1.003-001-S01, финансиран от Европейски Фонд за Регионално Развитие чрез оперативна програма „Наука и Образование за Интелигентен Растеж“.

Публикувани материали по дисертацията

Научни публикации

1. **Mladenova, S.**, Todorova, M., Savova, M., Georgiev, M.I., Mihaylova, L. 2023. Maackiain mimics caloric restriction through *aak-2*-mediated lipid reduction in *Caenorhabditis elegans*. *International Journal of Molecular Sciences* 24(24), 17442 (IF₂₀₂₃ **4.9, Q1**).
2. **Mladenova, S.**, Savova, M.S., Marchev, A.S., Ferrante, C., Orlando, G., Wabitsch, M., Georgiev, M.I. 2022. Anti-adipogenic activity of maackiain and ononin is mediated via inhibition of PPAR γ in human adipocytes. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 149, 112908 (IF₂₀₂₂ **7.5, Q1**).
3. **Mladenova, S.**, Vasileva, L., Savova, M.S., Marchev, A., Tews, D., Wabitsch, M., C. Ferrante, C., Orlando, G., M. Georgiev, M.I. 2021. Anti-adipogenic effect of *Alchemilla monticola* is mediated via PI3K/AKT signaling inhibition in human adipocytes. *Frontiers in Pharmacology* 12, 707507 (IF₂₀₂₁ **5.988, Q1**).

Общ импакт фактор (IF): 18.388

Участия на научни форуми

Устни доклади

1. Savova M.S., Todorova M.N., Mladenova S.G., Binev B.K., Georgiev M.I., Mihaylova L.V. 2025 Cross-talk between PI3K/AKT/GSK3 and AMPK/SIRT1 signaling pathways in the development of obesity and metabolic disorders. *6th International Conference on Natural Products Utilization: from Plants to Pharmacy Shelf*, 27-30 Май, Банско, България.
2. Михайлова, Л., Савова, М., Тодорова, М., **Младенова, С.**, Пройкова, Н., Балчева-Сивенова, Ж., Георгиев, М.И. 2023. Интегриране на молекулярна фармакология за ускорено установяване на природни молекули против затлъстяване. *VIII^{-ми} Конгрес по Фармация с Международно Участие*, 27-30 Април, Боровец, България.
3. Georgiev, M.I., Savova, M.S., Mladenova, S. 2022. Anti-obesity molecules of natural origin. *11th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries*, 6-10 October, Ohrid, Republic of North Macedonia.
4. Vasileva, L., Savova, M., **Mladenova, S.**, Amirova, K., Blacheva-Sivenova, Z., Georgiev, M.I. 2021. Human adipocytes react with browning upon caffeic and chlorogenic acids co-treatment. *1st International Conference on Plant Systems Biology and Biotechnology*, 14-17 June, Golden Sands Black Sea resort, Bulgaria.

Постерни презентации

1. **Mladenova, S.**, Savova, M., Mihaylova, L., Todorova, M., Georgiev, M.I. 2023. Maackiain restricts lipid accumulation in glucose-fed *Caenorhabditis elegans*. *5th International Conference on Natural Products Utilization*, 30 May - 2 June 2023, Sts. Constantine and Helena Resort, Bulgaria.
2. Mihaylova, L., **Mladenova, S.**, Savova M., Balcheva-Sivenova, J., Marchev, A., Georgiev M.I. 2022. PPAR γ inhibition mediates *Alchemilla monticola* Opiz anti-adipogenic effect in human adipocytes. *11th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries*, 6-10 October, Ohrid, Republic of North Macedonia.
3. **Mladenova, S.**, Vasileva, L., Savova, M., Marchev, A., Koycheva, I., Georgiev, M.I. 2021. Astragalin and quercitrin exert anti-obesity potential through PPAR γ -mediated mechanism. *1st International Conference on Plant Systems Biology and Biotechnology*, 14-17 June, Golden Sands Resort, Bulgaria.