



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

**Маг-фарм. Мартина Стоянова Савова**

**МЕХАНИЗМИ НА МОДУЛИРАНЕ ПРОЦЕСИТЕ НА  
ЗАТЛЪСТЯВАНЕ ПРИ *ИН ВИТРО* МОДЕЛ НА  
ЧОВЕШКИ АДИПОЦИТИ ЧРЕЗ ПРИЛАГАНЕ НА  
БИОЛОГИЧНО-АКТИВНИ МОЛЕКУЛИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

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

**Научен ръководител: Проф. д-р Милен И. Георгиев**

**Членове на научното жури: Проф. д-р Людмила Кабаиванова  
Доц. д-р Петя Димитрова  
Чл.-кор. проф. д-р Алберт Кръстанов, дтн  
Чл.-кор. проф. д-р Цветалина Танкова, дмн  
Проф. Магдалена Кондева-Бурдина, дф**

**Пловдив, 2023**



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

**Маг-фарм. Мартина Стоянова Савова**

**МЕХАНИЗМИ НА МОДУЛИРАНЕ ПРОЦЕСИТЕ НА  
ЗАТЛЪСТЯВАНЕ ПРИ *ИН ВИТРО* МОДЕЛ НА  
ЧОВЕШКИ АДИПОЦИТИ ЧРЕЗ ПРИЛАГАНЕ НА  
БИОЛОГИЧНО-АКТИВНИ МОЛЕКУЛИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

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

**Научен ръководител: Проф. д-р Милен И. Георгиев**

**Членове на научното жури:** Проф. д-р Людмила Кабаиванова  
Доц. д-р Петя Димитрова  
Чл.-кор. проф. д-р Алберт Кръстанов, дтн  
Чл.-кор. проф. д-р Цветалина Танкова, дмн  
Проф. Магдалена Кондева-Бурдина, дф

**Пловдив, 2023**

Дисертационният труд е написан на 131 страници. Той е онагледен с 38 фигури и 9 таблици. Цитирани са 218 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 се на 18.05.2023 година.

Докторантът е отчислен с право на защита със Заповед № I-136/27.09.22 година на директора на ИМикБ – БАН, Проф. д-р Пенка Петрова, дн.

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.

<b>Съдържание:</b>	
<b>Използвани съкращения и символи</b>	4
<b>I. ВЪВЕДЕНИЕ</b>	6
<b>II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ</b>	8
<b>III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ</b>	10
<b>IV. РЕЗУЛТАТИ</b>	13
1. Фитохимично охарактеризиране на експерименталните екстракти от <i>Z. jujuba</i> , <i>P. hydroper</i> и <i>P. aviculare</i>	13
2. <i>Ин vitro</i> скрининг за оценка на анти-адипогенния потенциал на избраните растителни екстракти от <i>Z. jujuba</i> , <i>P. aviculare</i> и <i>P. hydroper</i>	18
2. <i>Ин vitro</i> определяне на анти-адипогенния механизъм на избрани вторични метаболити от екстракт от <i>Z. jujuba</i> при човешки адипоцити - апигенин, бетулинова и маслинова киселина	23
3. Ефект на розмаринова киселина върху адипогенезата и съпътстващото възпаление при <i>ин vitro</i> модел на затлъстяване	29
4. <i>Ин vivo</i> валидиране на липидо-понижаващия ефект на бетулинова киселина и определяне на молекулярния механизъм на действие при <i>C. elegans</i>	34
<b>V. ДИСКУСИЯ</b>	41
1. Екстракт от хинап проявява най-изразена анти-адипогенна активност при <i>ин vitro</i> модел на затлъстяване	41
2. Бетулиновата киселина показва най-обещаващо инхибиране на липидното натрупване на клетъчно ниво	41
3. Розмариновата киселина показва анти-адипогенен потенциал и ограничава възпалителния отговор при човешки адипоцити	43
4. Бетулинова киселина потиска липидния синтез и стимулира енергоразхода в <i>ин vivo</i> модел на затлъстяване при <i>C. elegans</i>	45
5. Заключение и бъдещи насоки	46
<b>VI. ИЗВОДИ</b>	50
<b>VII. ПРИНОСИ</b>	51
<b>Благодарности</b>	52
<b>Публикувани материали по дисертацията</b>	54

## Използвани съкращения и символи

$\Delta G$  - свободна енергия на свързване

$K_i$  - афинитетна константа

На български език:

ВЕТХ - високоефективна течна

хроматография

иРНК - информационна РНК

ЯМР - ядрено-магнитен резонанс

На английски език:

aak-2 - orthologue of human AMPK

ACC - acetyl-CoA carboxylase

acs-2 - acyl-CoA synthetase

ADIPOQ - adiponectin

АКТ - protein kinase B

AMPK - adenosine monophosphate -  
activated protein kinase

atgl-1 - fasting-responsive adipose

triglyceride lipase

C/EBP - CCAAT/enhancer-binding  
protein

cDNA - complementary DNA

FASN - fatty acid synthase

fat - fatty acid desaturases

GLUT4 - glucose transporter type 4

hlh-11 - helix loop helix-11

HO-1 - heme oxygenase-1

IL - interleukin

lipl-3 - liposomal lipase-3

LOD - limit of detection

LOQ - limit of quantification

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-  
diphenyl tetrazolium bromide

NGM - nematode growth media

NR - Nile red

nhr-49 - nuclear hormone receptor 49

ORO - oil red O

PGC1A - peroxisome proliferator-  
activated receptor gamma co-activator 1  
alpha

PI3K - phosphoinositide 3-kinase

pod-2 - polarity and osmotic sensitivity  
defect

PPAR - peroxisome proliferator-activated  
receptor

RPL13A - ribosomal protein L13a

RT-qPCR - real-time quantitative reverse  
transcription polymerase chain reaction

sbp-1 - sterol regulatory element binding  
protein-1

SEM - standard error of the mean

SGBS - Simpson-Golabi-Behmel  
syndrome

SREBP - sterol regulatory element-binding  
protein

TGF - transforming growth factor

TUBB - tubulin

UCP1 - uncoupling protein 1

## I. ВЪВЕДЕНИЕ

Разпространението на затлъстяването достигна епидемични размери през последните десетилетия (Okunogbe et al., 2022). Смъртността, която се асоциира с наднорменото тегло и затлъстяването надхвърля 2.8 милиона души всяка година и представлява значителната част от общата смъртност от социално-значими заболявания, свързани с начина на живот (Kumanyika et al., 2020). Поради това са необходими незабавни мерки за превенция и разрешаване на този нарастващ глобален проблем.

Растенията са източници на структурно разнообразни биологично-активни молекули, чиито потенциал за контрол на затлъстяването не е проучен достатъчно задълбочено. Многокомпонентният химичен състав на растителните екстракти осигурява природни молекули, чийто биологичен ефект се постига чрез повлияване на повече от един молекулярен механизъм, което е важно предимство пред синтетичните лекарства (Martel et al., 2017).

Модулирането на сигналните пътища, свързани с адипогенезата, енергийния метаболизъм, междуклетъчната и вътреклетъчната комуникация може да осигури нов подход за превенция на наднормено тегло и затлъстяване. Сред потенциалните молекулярни мишени за повлияване на затлъстяване са главните адипогенни транскрипционни фактори – ССААТ/enhancer-binding protein alpha (C/EBP $\alpha$ ) и peroxisome-proliferator activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ), както и регулираните от тях молекулярни участници в липогенезата като sterol regulatory binding protein 1 (SREBP1), fatty acid synthase (FASN) и acetyl-CoA carboxilase (ACC; Ramirez et al., 2020). В допълнение, стимулирането на липолизата, е паралелен механизъм, чрез който може да се контролира наднорменото тегло (Arner et al., 2019). Друг ключов сигнален път е този на phosphoinositide 3 kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) каскадата, който участва в множество клетъчни функции, включително диференциация и инсулин-стимулирано усвояване на глюкоза в адипоцитите (Foukas et al., 2013; Jung et al., 2020; Mandl et al., 2019; Song et al., 2015). Освен нарушенията в липидния метаболизъм, при затлъстяване се наблюдава и системно хронично подлежащо възпаление, чието, понижаване на е подход чрез за благоприятстване на метаболитната хомеостаза в организма.

Комплексните фактори, определящи развитието на затлъстяването, налагат необходимостта от разработване на средства за превенция и терапия чрез прицелване в повече от един молекулярен механизъм. Структурирането на експериментален подход, комбиниращ молекулярна фармакология, етнофармакология и фитохимичен анализ би

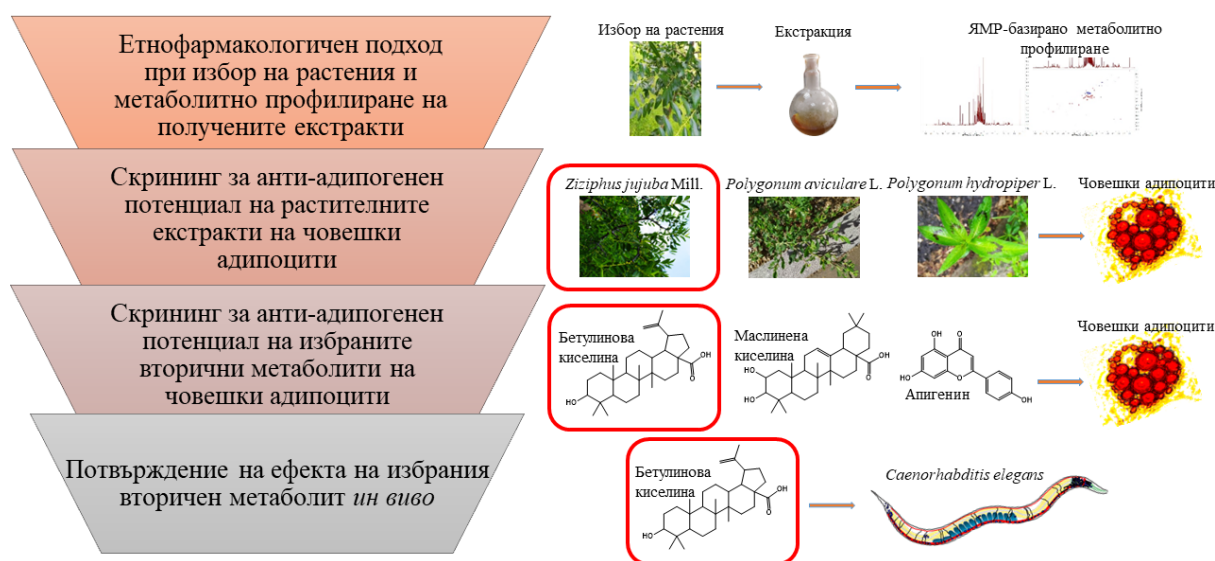
позволило детайлно изясняване на терапевтичния потенциал на екстракти от лечебни растения и определяне на чисти молекули с биологична активност при затлъстяване.

Стратегията, в настоящия дисертационен труд, се основава на прилагане на *in vitro* платформа за оценка на ефекта на растителни екстракти и техни метаболити върху функцията и физиологията на мастните клетки, като основни структурни единици на мастната тъкан, и модулиране на възпалителния им отговор. Създаването на клетъчно-базирана моделна система за изучаване на затлъстяването дава и допълнителна възможност за изграждане на хипотеза за конкретен молекулярен механизъм на действие. Експериментите на клетъчно ниво са надградени при моделен организъм *Caenorhabditis elegans* – посочен в редица изследвания, като подходяща моделна система за проследяване ефекта на биологично-активни вещества върху липидния метаболизъм и свързаните с него нарушения (Li et al., 2020a; Yue et al., 2021a).

## II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

### 1. Цел

Настоящият дисертационен труд има за цел да изследва влиянието на екстракти от *Z. jujuba* (хинап), *P. aviculare* (пача трева), *P. hydropiper* (водно пипериче) и техни вторични метаболити върху процесите на адипогенеза и натрупване на липиди *in vitro* в модел на човешки адипоцити и валидирането на ефекта на най-обещаващите сред получените метаболити в *in vivo* модел на затлъстяване при нематоди от вида *C. elegans*. Използваната експериментална стратегия е обобщена на Фигура 1.



**Фигура 1.** Експериментална стратегия, използвана в настоящия дисертационен труд.

### 2. Задачи

- 2.1. Подбор на растения, според налични етнофармакологични данни за ефект при затлъстяване.
- 2.2. Определяне на фитохимичния състав на избраните растителни екстракти чрез метаболитно профилиране посредством ядрено-магнитен резонанс (ЯМР).
- 2.3. Изследване на влиянието на екстракти от *Z. jujuba*, *P. aviculare* и *P. hydropiper* върху процесите на адипогенеза и липолиза при *in vitro* модел на човешки адипоцити.
- 2.4. Изучаване на механизма на действие на екстракти от *Z. jujuba*, *P. aviculare* и *P. hydropiper* върху човешки адипоцити.
- 2.5. Провеждане на *in silico* докинг симулация с природни молекули, избрани според данните за фитохимичния състав на изследваните екстракти.



- 2.6. Установяване механизма на действие на селектираните вторични метаболити – апигенин, бетулинова и маслинена киселина в *in vitro* модел на човешки адипоцити.
- 2.7. Потвърждаване на анти-адипогенния ефект на бетулинова киселина и изясняване на сигналните механизми при модел на затлъстяване при *C. elegans*.

### III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### 1. Събиране на растителен материал и екстракция

Листната маса от хинап и надземната част от водно пипериче са събрани от района на с. Звъничево, а надземните части от пача трева – гр. Сандански. Събраният растителен материал е идентифициран и депозиран в колекцията на БАН. С лиофилизирания растителен материал се извършва екстракция в 50% воден метанол (1:30 w/v) с ултразвук в продължение на 20 минути при стайна температура. Получените екстракти са концентрирани и лиофилизирани до получаване на сух екстракт.

#### 2. Ядрено-магнитно-резонансна (ЯМР) спектроскопия

Спектрални данни от  $^1\text{H}$  ЯМР и 2D ЯМР са отчетени при 25 °C на спектрометър Bruker AVII + 600 (Karlsruhe, Germany), с работна честота 600.13 MHz и време за релаксация 4.07 s според протокола, подробно описан от Georgiev et al. (2015).

#### 3. Високоэффективна течна хроматография (ВЕТХ)

Съдържанието на апигенин в екстракта от хинап е определено чрез ВЕТХ, според описаните от Bardakci et al. (2019) условия. Методът за детекция и количествено определяне на апигенин е валидиран спрямо линейност и чувствителност чрез определяне на границата на откриване (limit of detection; LOD) и границата на количествено определяне (limit of quantification; LOQ).

#### 4. *Ин силико* докинг анализ

Докинг изчисленията са извършвани чрез софтуер Autodock Vina на PyRx 0.8. Кристалните структури на целевите протеини са изведени от Protein Data Base (PDB, [www.wwpdb.org](http://www.wwpdb.org)) с PDB ID, както следва: 1NWQ за C/EBP $\alpha$ ; 2P4Y за PPAR $\gamma$ , 1O6L за АКТ, 5ITD за PI3K.

#### 5. *Ин vitro* оценка на анти-адипогенен потенциал

##### 5.1. Клетъчно култивиране и третиране

Човешки преадипоцити, изолирани от пациент със синдром на Симпсън-Голаби-Бемел са култивирани и диференцирани в съответствие с оптималните условия (Wabitsch et al., 2001). Успоредно с индуцирането на адипогенната диференциация (ден 0) клетките са третирани, както и при всяко обновяване на хранителната среда съответно на ден 4<sup>ти</sup> и

8-ми (Фиг. 6). Всички използвани концентрации са избрани след оценка на жизнеспособността на клетките посредством 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) анализ.

Екстрактите от *Z. jujuba* (хинап), *P. aviculare* (пача трева) и *P. hydro Piper* (водно пипериче) са добавени към хранителната среда при крайни концентрации от 5, 10 и 25  $\mu\text{g/mL}$ , докато чистите вещества – апигенин, бетулинова и маслиненна киселина в концентрации от 0.25, 0.5 и 1  $\mu\text{M}$ , а розмариновата киселина – в концентрации от 1, 5 и 25  $\mu\text{M}$  и орлистат (използван като позитивна контрола) в концентрация от 5  $\mu\text{M}$ . Група третирана с 0.02% DMSO, е включена като контрола за изключване влиянието на носителя (Vehicle). Всички анализи са проведени 24 часа след последното третиране съответно на 9-ти ден от диференциацията (Фиг. 2).



**Фигура 2.** Схема на хода на адипогенна диференциация на Simpson-Golabi-Behmel syndrome (SGBS) човешки адипоцити и интервалите на третиране в дни (d).

5.2. Анализ за вътреклетъчно натрупване на липиди (адипогенеза) и освобождаване на глицерол (адиполиза)

Липидното оцветяване с Oil red O (ORO) служи за количественото определяне на натрупаните липиди. Ефекта върху базалната липолиза е оценен индиректно чрез определяне на концентрацията на отделения в културалната среда глицерол, като един от продуктите на хидролизата на триглицеридите.

5.3. Полимеразна верижна реакция в реално време (RT-qPCR) на иРНК

Тотална РНК от зрели адипоцити е изолирана с кит Quick-RNA Miniprep от Zymo Research (#R1055, Irvine, CA, USA). Обратна транскрипция е извършена посредством cDNA Canvax FirstStrand кит (#PR008, Cordoba, Spain). Експресията на основните гени, свързани с адипоцитна диференциация, е изследвана посредством RT-qPCR, използвайки Sso EvaGreen SuperMix (#1725204) на система CFX96 (Bio-Rad).

#### 5.4. Имуноблот

За протеиновата екстракция се използва RIPA лизиращ буфер. Еквивалентни количества тотален протеинов лизат са разделени посредством вертикална електрофореза и прехвърлени на нитроцелулозни мембрани. След блокиране, мембраните са инкубирани със съответното първично антителио за едно денонощие. За визуализиране на първичните антителиа срещу таргетните протеини, се извършва инкубиране с видово-специфично вторично антителио, последвано от измерване интензитета на флуоресценция на ChemiDoc MP система за визуализация (Bio-Rad). Данните за нивата на избраните протеини са нормализирани спрямо референтен протеин посредством софтуер Image Lab 6.0.1 (Bio-Rad).

#### 6. *Ин vivo* модел на затлъстяване, предизвикано от глюкоза при *C. elegans*

##### 6.1. Индуциране на липидно натрупване и третиране при *C. elegans*

Нематодите (N2 Bristol *C. elegans* и *Escherichia coli* OP50) са закупени от Caenorhabditis Genetic Centre (CGC, University of Minnesota, USA). Нематодите са култивирани при 20 °C съгласно стандартните процедури, върху петрита с твърда хранителна среда nemathode growth medium (NGM) с или без 2% глюкоза, посяти с *E. coli* OP50. За описаните експерименти е получена възрастово-синхронизирана популация от ларви. По време на първите два ларвни стадия, хранителният източник е *E. coli* OP50, след което нематодите са трансферирани върху нови петрита с NGM среда, аналогично, с или без глюкоза, но предварително третирани с бетулинова киселина (10, 25 и 50 µM) или носител. Като липидо-понижаваща контрола е използван орлистат в концентрация от 12 µM. За хранителен източник, по време на третирането, е използвана с топлинно-инактивирана *E. coli* OP50, с цел предотвратяване вероятността за метаболизиране на изследваните молекули. След достигане на четвърти ларвен стадий (L4), нематодите са събирани чрез смиване с M9 буфер и са проведени анализи, съответно – оцветяване на липидните натрупвания, конфокална микроскопия и изолиране на РНК.

##### 6.2. Оценка на жизненост и проследяване на фенотипни показатели

Провеждането на фенотипни анализи, които удостоверяват отсъствието на промени, в жизнеността, репродуктивния капацитет, двигателната активност и продължителността на живот при моделния организъм *C. elegans*, предоставят ценна информация по отношение на безопасността на използваните концентрации на третиране.

### 6.3. Оцветяване на натрупани липиди

Оцветяването на натрупаните липиди дава възможност за визуализиране на липидните депа и тяхното количествено опреляне. Използвани са две липидни багрила – при оцветяването с ORO количеството на натрупаните липиди е представено като нормализиран интензитет на пикселите спрямо контролната група нематоди, отглеждани на среда с 2% глюкоза. За липидното оцветяване с Nile red (NR) се направени микроскопски препарати и заснети на конфокален микроскоп.

### 6.4. Конфокална микроскопия

Конфокални флуоресцентни изображения на нематодите от всяка група са заснети на конфокалната система Stellaris 5, снабдена с инвертен микроскоп Dmi8 от Leica (Wetzlar, Germany). Изображенията са анализирани посредством софтуера ImageJ, като флуоресцентния сигнал се преобразува в corrected total cell fluorescence (CTCF) и получените стойности са нормализирани спрямо контролната група нематоди, отглеждани на среда с 2% глюкоза (Stuhr et al., 2022).

### 6.5. Полимеразна верижна реакция в реално време на иРНК и микроРНКи

Изолирането на тотална РНК е извършвано с фенолния реагент PureZol (#7326809, Bio-Rad). Обратната транскрипция се извършва с кит за синтез на комплементарна ДНК (cDNA) – First strand cDNA synthesis kit (Canvax, Cordoba, Spain). За обратната транскрипция на избраните микроРНКи е използван Revert Aid H Minus First Strand кит (#K1632) за синтез на cDNA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) и stem-loop праймери (Chen et al., 2005).

## 7. Статистически анализ

Статистическата обработка на данните е извършвана в SigmaPlot v11.0 от Systat Software GmbH (Erkrath, Germany). Данните са представени като средна стойност  $\pm$  стандартна грешка на средната стойност (SEM). Разликите между експерименталните групи са изчислени чрез one-way analysis of variance (ANOVA), последван от Tukey's post hoc test. За статистически значими различия между групите се приемат при стойности на  $p < 0.05$ . Кривите на преживяемост на различните групи са сравнени чрез log-rank test за откриване на статистическа значимост между тях. Всички представени данни са получени в резултат от провеждането на поне три независими експеримента.

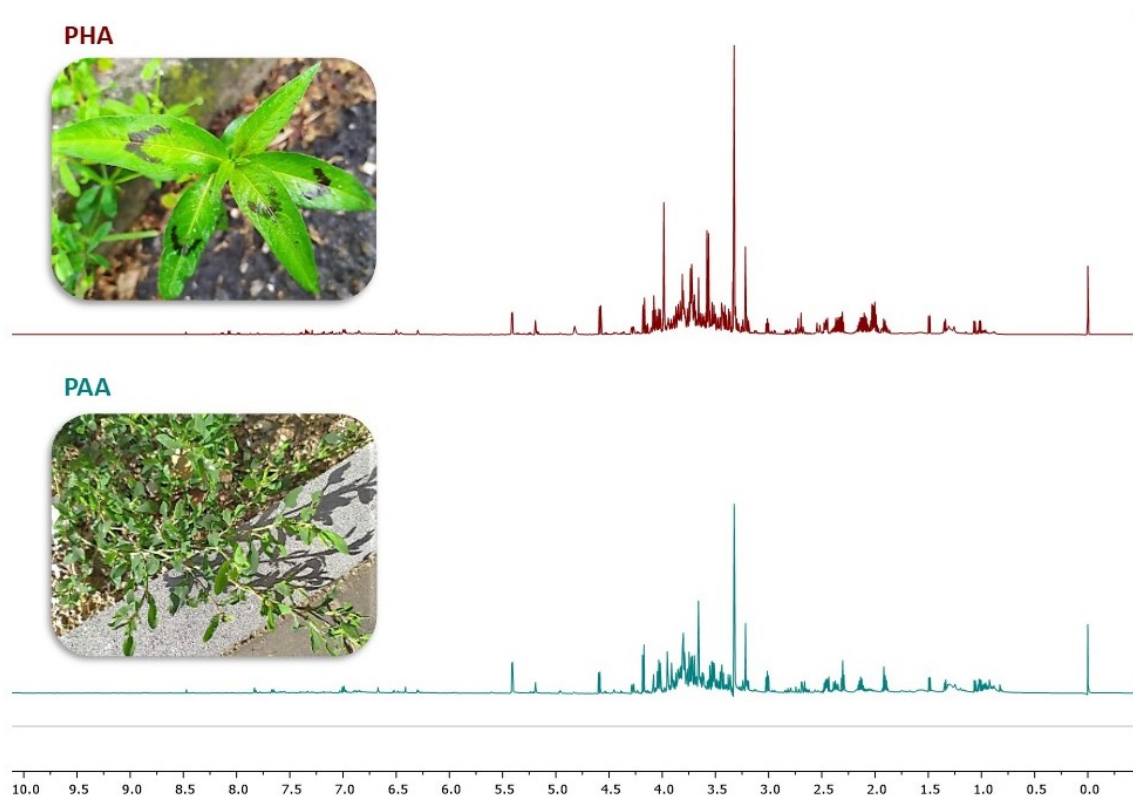
## V. РЕЗУЛТАТИ

### 1. Фитохимично охарактеризиране на екстрактите от *Z. jujuba*, *P. hydroper* и *P. aviculare*

Метаболитното профилиране на растителните екстракти е ключово при идентифицирането на природни молекули, отговорни за наблюдаваната биологична активност. В настоящия труд са изследвани екстракти от листна маса от *Z. jujuba* (хинап, ZJL), надземни части от *P. hydroper* (водно пипериче, РНА) и *P. aviculare* (пача трева, РАА).

#### 1.1. Метаболитно профилиране посредством ЯМР

Екстрактите от представителите на рода *Polygonum* очаквано показват сходен фитохимичен профил при ЯМР-базираното метаболитно профилиране. Спектралните данни от получените протонни ЯМР спектри (Фиг. 7) са със сравнени тези от литературата (Georgiev et al., 2011; Georgiev et al., 2015; Gowda et al., 2015; Wolfender et al., 2013; Yang et al., 2014). Идентифицираните първични и вторични метаболити в екстрактите от *P. aviculare* и *P. hydroper* са обобщени в Таблица 1.



**Фигура 3. Протонни ЯМР-спектри на екстракти от надземни части от *P. aviculare* (пача трева, РАА) и *P. hydroper* (водно пипериче, РНА).**

**Таблица 1. Химично отместване ( $\delta$ ) и константа на сдвояване ( $J$ ) на метаболитите, идентифицирани чрез анализ на протонните ЯМР спектри на екстрактите от *P. aviculare* (пача трева) и *P. hydropiper* (водно пипериче).**

Метаболити	<i>P. aviculare</i> , ( $\delta$ , ppm; $J$ , Hz)	<i>P. hydropiper</i> ( $\delta$ , ppm; $J$ , Hz)
<b>Аминокиселини</b>		
Аланин	1.49 (d, $J = 7.2$ )	1.49 (d, $J = 7.27$ )
Аспрагинова киселина	2.68 (dd, $J = 15.3, 3$ ), 2.81 (dd, $J = 17.3, 3.6$ ), 3.88 (dd, $J = 12.2, 2.81$ )	-
Валин	1.01 (d, $J = 7.1$ ), 1.07 (d, $J = 7.1$ )	1.01 (d, $J = 7.0$ ), 1.06 (d, $J = 7.0$ )
Глутамин	-	2.13 (m), 2.46 (m)
Глутаминова киселина	2.11 (m), 2.46 (m), 3.75 (dd, $J = 10.5, 8.8$ )	-
Левцин	0.97 (d, $J = 6.4$ ), d 0.99 (d, $J = 6.5$ )	-
Треонин	1.34 (d, $J = 6.5$ )	-
<b>Въглехидрати</b>		
$\alpha$ -Глюкоза	5.19 (d, $J = 3.7$ )	5.19 (d, $J = 3.73$ )
$\beta$ -Глюкоза	4.58 (d, $J = 7.9$ )	4.59 (d, $J = 7.9$ )
Сукроза	5.41 (d, $J = 3.8$ )	5.41 (d, $J = 3.83$ )
Фруктоза	4.17 (d, $J = 8.7$ )	4.18 (d, $J = 8.67$ )
<b>Органични киселини</b>		
$\gamma$ -Амино-бутират	1.9 (m), 2.31 (t, $J = 7.2$ ), 3.01 (t, $J = 7.3$ )	1.9 (m), 2.31 (t, $J = 7.35$ ), 3.01 (t, $J = 7.4$ )
Галова киселина	7.03 (s)	-
Мравчена киселина	8.48 (s)	-
Фумарова киселина	6.54 (s)	6.53 (s)
<b>Флавоноиди</b>		
Кампферол	6.28 (d, $J = 2.0$ ), 6.49 (d, $J = 2.0$ ), 8.07 (d, $J = 8.9$ ), 7.00 (d, $J = 8.5$ )	6.28 (d, $J = 2.0$ ), 6.49 (d, $J = 2.0$ ), 7.00 (d, $J = 8.5$ )

Кверцетин	6.3 (d, $J = 1.7$ ), 6.49 (d, $J = 2.0$ ), - 7.75 (d, $J = 2.3$ ), 6.99 (d, $J =$ 8.9), 7.7 (dd, $J = 8.6, 2.2$ )
Мирицетин	6.3 (d, $J = 2.0$ ) 6.49 (d, $J = 2.0$ ), - 7.34 (s)
Мирицитрин	0.98 (d, $J = 6.1$ ), 3.35 – 3.93 (m), - 5.35 (d, $J = 1.9$ ), 6.3 (d, $J = 2.0$ ), 6.97(s)
Рутин	6.29 (d, $J = 2$ ), 6.49 (d, $J = 2.4$ ), 6.3 (d, $J = 2$ ), 6.49 (d, $J = 2.3$ ), 7.68 (d, $J = 2.1$ ), 6.98 (d, $J =$ 6.98 (d, $J = 8.5$ ) 7.62 (dd, $J =$ 8.5), 7.57 (dd, $J = 8.5, 2.1$ ), 5.02 8.5, 2.1) (d, $J = 7.5$ ), 4.53 (d, $J = 1.7$ )
Хиперозид	7.87 (d, $J = 1.2$ ), 6.85 (d, $J=8.6$ ), - 6.43 (s), 6.30 (d, $J = 2.5$ ), 5.17 (d, $J = 7.9$ )

На базата на метаболитно профилиране с ЯМР на екстракт от хинап, чрез сравняване на получените спектри с данни от литературата (Georgiev et al., 2011; Georgiev et al., 2015; Gowda et al., 2014; Wolfender et al., 2013) са идентифицирани характерни сигнали за някои първични и вторични метаболити, обобщени в Таблица 2. Наличието на апигенин (Moharram et al., 2021; Wolfender et al., 2013) в екстракт от хинап е потвърдено чрез анализ на получените протонни ( $^1\text{H}$ ) и двумерен хетероядрен корелационни ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC) ЯМР спектри (Фиг. 4).

**Таблица 2.** Химично отместване ( $\delta$ ) и константа на сдвояване ( $J$ ) на метаболитите, идентифицирани чрез анализ на протонния ЯМР спектър на екстракта от *Z. jujuba*.

Метаболити	Химично отместване ( $\delta$ , ppm)	Константа на сдвояване ( $J$ , Hz)
<i>Аминокиселини</i>		
Аланин	1.49	(d, $J = 7.2$ )
Валин	1.01/1.07	(d, $J = 7.3$ )/(d, $J = 7.1$ )
Глутамин	2.14/2.39	(m)/(m)
Треонин	1.33	(d, $J = 6.9$ )



### **Въглехидрати**

$\alpha$ -глюкоза 5.19 (d,  $J = 3.8$ )

$\beta$ -глюкоза 4.59 (d,  $J = 7.9$ )

Сукроза 5.41 (d,  $J = 3.9$ )

Фруктоза 4.18 (d,  $J = 8.6$ )

### **Органични киселини**

$\gamma$ -амино-бутират 1.90/2.30/3.01 (m)/(t,  $J = 7.5$ )/(t,  $J = 7.3$ )

Мравчена киселина 8.47 (s)

Оцетна киселина 1.90 (s)

Сукцинова киселина 2.40 (s)

Фумарова киселина 6.48 (s)

### **Флавоноиди**

Апигенин 6.66/6.31/6.52/8.08/6.98 (s)/(d,  $J = 2.0$ )/(d,  $J = 2.0$ )/(d,  $J = 9.0$ )/(d,  $J = 8.5$ )

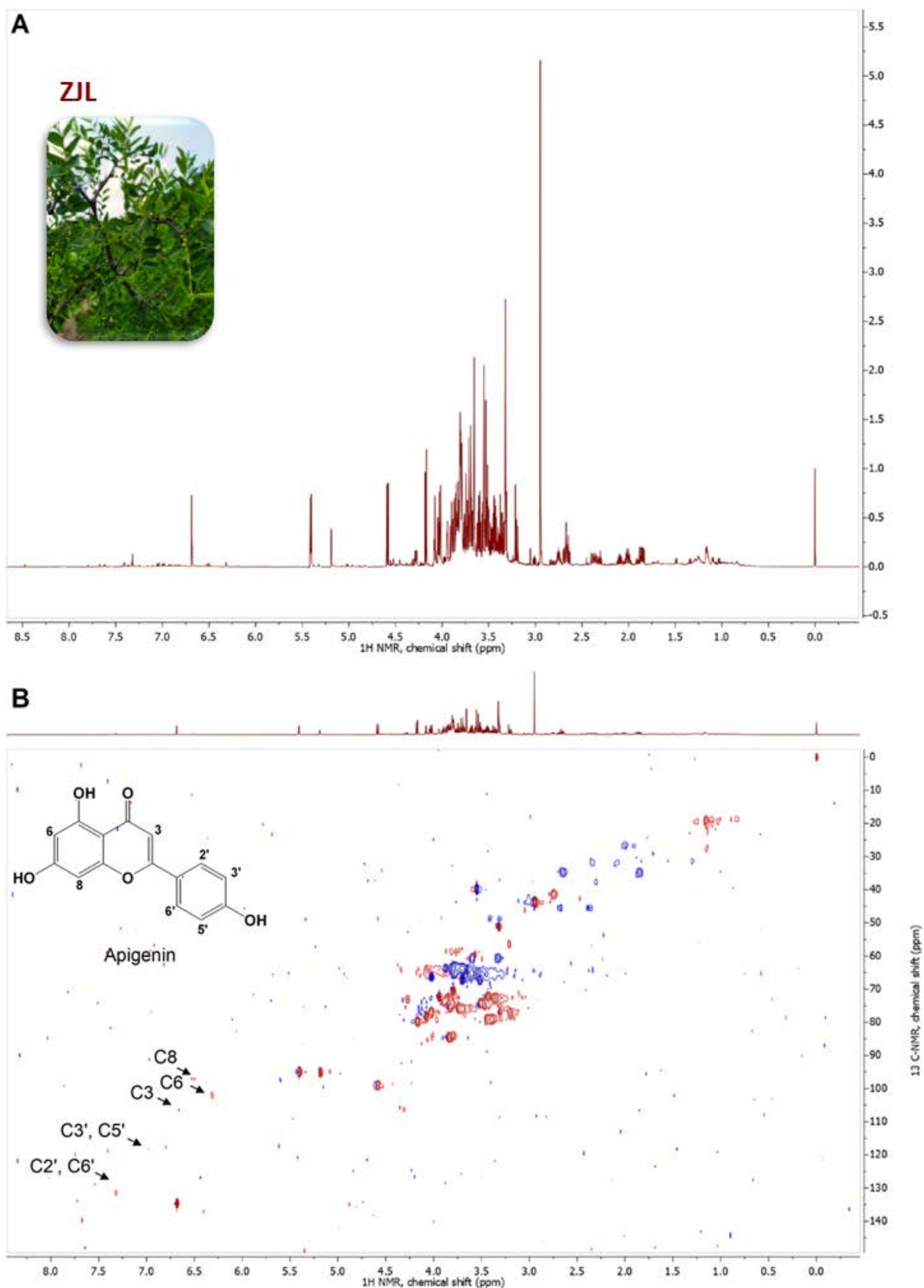
Кампферол 6.32/6.50/8.08/7.00 (d,  $J = 2.0$ )/(d,  $J = 2.1$ )/(d,  $J = 9.0$ )/(d,  $J = 8.5$ )

Кверцетин 6.32/6.50/7.72/7.00/7.62 (d,  $J = 2.0$ )/(d,  $J = 2.1$ )/(d,  $J = 2.0$ )/(d,  $J = 8.5$ )/(dd,  $J = 8.5; 2.1$ )

Рутин 6.32/6.50/7.67/6.82/7.62/5.02/4.54 (d,  $J = 2.0$ )/(d,  $J = 2.1$ )/(d,  $J = 2.2$ )/(d,  $J = 9.3$ )/(dd,  $J = 8.5; 2.1$ )/(d,  $J = 7.5$ )/(d,  $J = 1.3$ )

#### 1.2. Количествено определяне на апигенин в екстракт от *Z. jujuba*

Съдържанието на апигенин е определено в екстракт от *Z. jujuba* (хинап) чрез ВЕТХ.и съответства на  $0.17 \pm 0.02$  mg/g сух екстракт. Чувствителността на метода е калкулирана като  $LOD = 3.3\sigma/S$  и  $LOQ = 10\sigma/S$ . Калибрационната крива ( $y = 8.89 \times 10^4 x + 4.28 \times 10^4$ ) показва добра линейна зависимост в областта между 5 и 100  $\mu\text{g/mL}$ , при  $R^2 = 0.9952$ . Стойностите получени за LOD и LOQ, са съответно 8.02 и 24.30  $\mu\text{g/mL}$ .



**Фигура 4. Метаболитно профилиране на екстракт от *Z. jujuba* (хинап, ZJL). Протонен ЯМР спектър на екстракта от хинап (А). Двумерен хетероядрен корелационен ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC) спектър на екстракт от хинап и характерните за апигенин сигнали (В).**

## 2. *In vitro* скрининг за оценка на анти-адипогенния потенциал на избраните растителни екстракти от *Z. jujuba*, *P. aviculare* и *P. hydropiper*

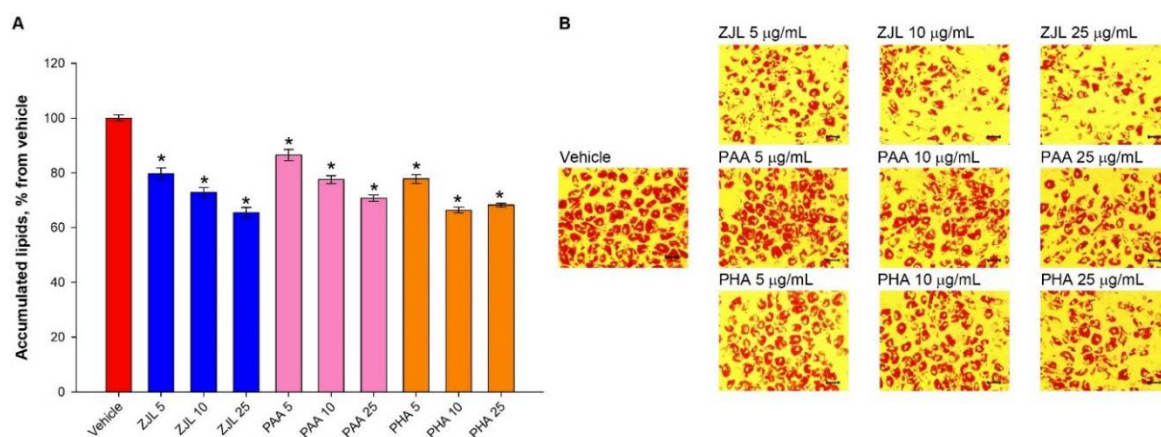
Екстрактите от избраните растения (*Z. jujuba*, *P. aviculare* и *P. hydropiper*), които според народната медицина са ефективни за терапия на затлъстяване и метаболитни нарушения, са изследвани в структурираната клетъчна платформа за оценка на анти-адипогенния им потенциал.

### 2.1. Определяне на клетъчна жизнеспособност

Резултатите от анализа за клетъчна жизнеспособност показват, че в концентрационния диапазон 1-100  $\mu\text{g/mL}$  и трите екстракта не понижават жизнеността на преадипоцитите, третирани в продължение на 24 часа което позволява извършването на последващите експерименти в тази моделна система.

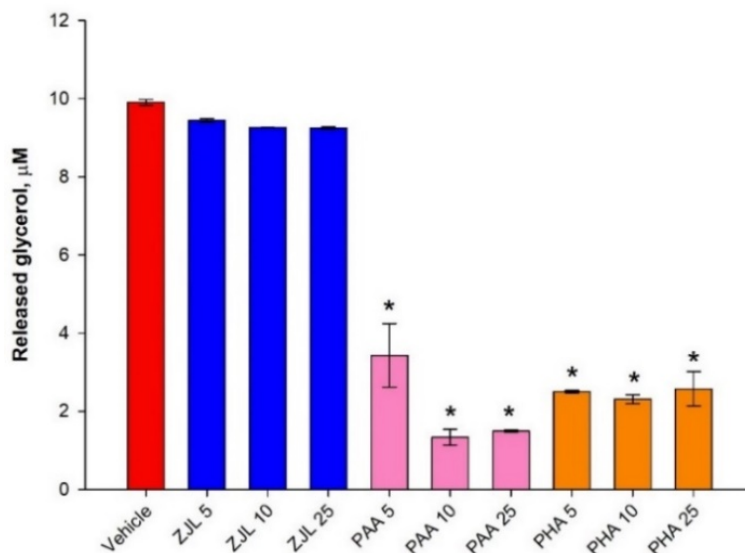
### 2.2. Анализ на вътреклетъчното натрупване на липиди и ефекта върху адиполизата

Представителни микроскопски снимки на оцветените адипоцити (Фиг. 5В) и количествено определяне на липидните депа (Фиг. 5А) разкриват значително и концентрационно-зависимо намаляване на натрупването на липиди в присъствие на изследваните екстракти.



**Фигура 5.** Екстрактът от *Z. jujuba* (хинап, ZJL) най-изразено потиска адипогенезата, в сравнение с прилагането на *P. aviculare* (пача трева, PAA) и *P. hydropiper* (водно пипериче, PHA). Спектрофотометрично определяне на натрупаните липиди, представено като процент от диференцираната контролна група (А). Представителни микроскопски изображения с увеличение 20 $\times$  (мащаб 50  $\mu\text{m}$ ) от оцветяване с Oil red O на ден 9 от адипоцитната диференциация (В). Данните са представени като средна стойност  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  сравнено с контролна група (Vehicle).

Получените резултати показват умерено понижаване концентрацията на глицерол, при третиране с екстракт от хинап, докато екстрактите от двете растения от род *Polygonum* показват драстично намаляне на отделения глицерол, следователно – инхибиране на базалната липолиза (Фиг. 6).

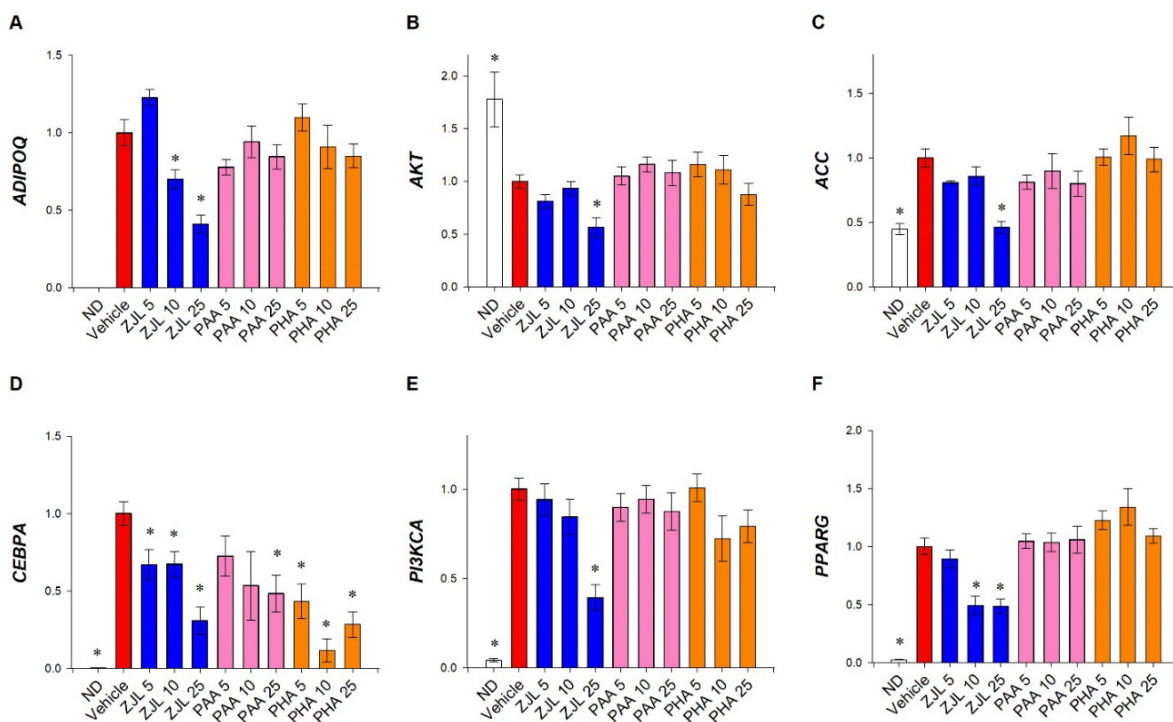


**Фигура 6.** Значително инхибиране на адиполизата се наблюдава при третиране с *P. aviculare* (пача трева, PAA) и *P. hydropiper* (водно пипериче), в сравнение с екстракта от *Z. jujuba* (хинап, ZJL). Концентрация на отделения в хранителната среда глицерол (µM) на ден 9 от адипоцитната диференциация. Данните са представени като средна стойност ± SEM, всяка експериментална група се състои от поне шест успоредни проби в три независими експеримента. \* $p < 0.05$  сравнено с диференцираната контролна група (Vehicle).

### 2.3. Полимеразна верижна реакция в реално време на иРНК

Понижаване на нивата на иРНК на *PPARG* (Фиг. 7F) са отчетени в резултат от третиране с екстракта от хинап, докато експресията на *CEBPA* (Фиг. 7D) е повлияна и от трите изследвани екстракта. По същия начин с повишаване на концентрацията на екстракта от хинап се понижава експресията на гена, кодиращ адипонектин (*ADIPOQ*, Фиг. 7A), както и *ACC* (Фиг. 7C). Анализът на генната експресия на *AKT* (Фиг. 7B) и *PI3KCA* (Фиг. 7E) показва статистически значимо повлияване единствено при прилагане на екстракта от хинап.

В обобщение, тези данни показват, че екстрактът от хинап повлиява експресията на ключови гени, участващи в адипо- и липогенезата.



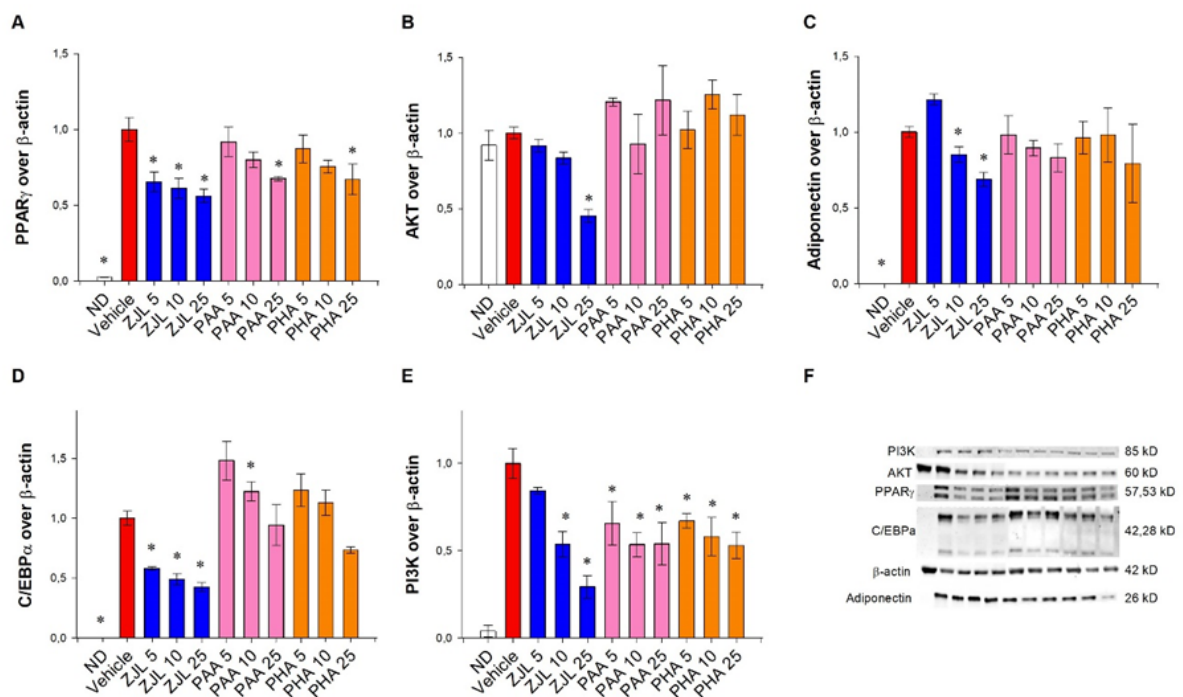
**Фигура 7.** Експресията на ключови за адипогенната диференциация гени е потисната в резултат от третирането с екстракт от *Z. jujuba* (хинап, ZJL), в сравнение с прилагането на екстракти от *P. aviculare* (пача трева, PAA) и *P. hydropiper* (водно пипериче, PHA). Относителна експресия на иРНК, нормализирана спрямо диференцираната контролна група (Vehicle) за следните гени *ADIPOQ* (A), *AKT* (B), *ACC* (C), *CEBPA* (D), *PI3KCA* (E), *PPARG* (F) получена при RT-qPCR анализ. *RPL13A* и *TUBB* са използвани като референтни гени. Всяка проба (от три независими експеримента) е анализирана в три технически повторения. Данните са представени като средна стойност  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  сравнено спрямо контролната група.

#### 2.4. Имуноблот за определяне експресията на протеини

Резултатите от имуноблот анализа разкриват, че с повишаване на концентрацията екстракта от хинап, намаляват протеиновите нива на PPAR $\gamma$  (Фиг. 8A), докато екстрактите от пача трева и водно пипериче повлияват експресията на този протеин единствено при третиране с концентрации от 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Потискане на експресията на C/EBP $\alpha$  (Фиг. 8D), както и на адипонектин (Фиг. 8C) е наблюдавано единствено при третиране с екстракта от хинап. Понижаване на протеиновата експресия на PI3K (Фиг. 8E) е наблюдавано след прилагане на всеки от изследваните екстракти. По отношение на третирането с екстракт от хинап, единствено 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  значително понижава нивата

на АКТ (Фиг. 8В), докато при другите екстракти, не е отчетена промяна по отношение този протеин.

Следователно, може да се обобщи, че анти-адипогенният ефект на екстракта от хинап се проявява в следствие на инхибиране на PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , адипонектин, както и PI3K/АКТ сигналния път, докато екстрактите от пача трева и водно пипериче повлияват само PI3K и PPAR $\gamma$ . Тъй като се установи, че екстрактът от хинап повлиява експресията на транскрипционно и транслационно ниво на всички ключови адипогенни фактори, засегнати в настоящия труд, този екстракт бе избран за последващи експерименти в използвания клетъчен модел на затлъстяване.



**Фигура 8.** Протеиновата експресия на изследваните, ключови за диференциацията на мастните клетки фактори, е потисната в най-голяма степен при прилагане на екстракт от *Z. jujuba* (хинап, ZJL), в сравнение с прилагането на екстрактите от *P. aviculare* (пача трева, PAA) и *P. hydro Piper* (водно пипериче, PHA). Имуноблот анализ се извършва за оценка на ефекта върху нивата на PPAR $\gamma$  (A), АКТ (B), adiponectin (C), C/EBP $\alpha$  (D) и PI3K (E). Представилтени изображения от блотовете използвани за детекция на съответните протеини (F).  $\beta$ -actin е използван при нормализиране като референтен протеин. Данните са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от три независими експеримента. \* $p < 0.05$  сравнено с диференцираната контролна група (Vehicle).

3. *In vitro* определяне на анти-адипогенния механизъм на избрани вторични метаболити от екстракт от *Z. jujuba* – апигенин, бетулинова и маслиненна киселина

От съдържащите се вторични метаболити в екстракта от хинап са избрани три природни молекули – апигенин, бетулинова и маслиненна киселина, които да бъдат включени по-нататък в експериментална схема за определяне на анти-адипогенния потенциал и изясняване на молекулярния механизъм на тяхното действие.

Установено е, че прилагането на избраните вторични метаболити не повлиява статистически жизнеността на преадипоцитите в избрания за третиране концентрационен диапазон (0.25-1  $\mu\text{M}$ ).

### 3.1. *In silico* докинг анализ

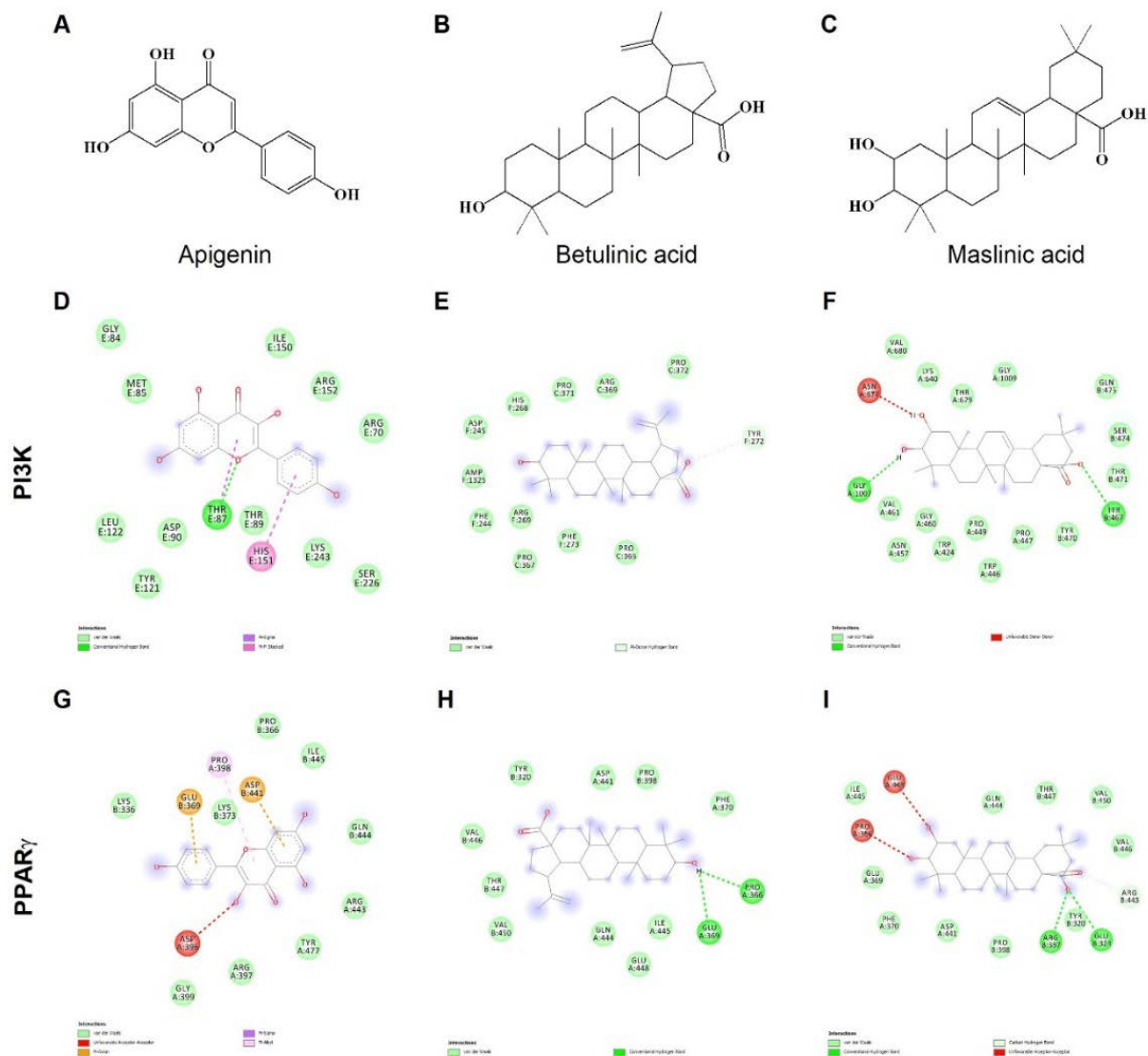
Афинитетът на избраните природни молекули към целеви протеини, участващи в адипогенезата и инсулиновото сигнализиране, е изразен чрез свободна енергия на свързване ( $\Delta G$ ) и афинитетна константа ( $K_i$ ; Таблица 3). С изключение единствено на свързването на апигенин към С/ЕВР $\alpha$ , всички съединения показват висок афинитети в ниския микромоларен диапазон (0.02–17.4  $\mu\text{M}$ ) спрямо всички тествани целеви протеини. Възможно взаимодействие с PI3K и PPAR $\gamma$  в обхвата на концентрациите на третиране (0.25–1  $\mu\text{M}$ ) е представено на Фигура 9. Като цяло, *in silico* симулацията извежда на преден план PI3K и PPAR $\gamma$  като потенциални прицелни протеинови структури за въздействието на апигенин, бетулинова и маслиненна киселина.

**Таблица 3. Теоретично изчислени свободна енергия ( $\Delta G$ , kcal/M) и афинитетна константа ( $K_i$ ,  $\mu\text{M}$ ) за взаимодействието между апигенин, бетулинова и маслиненна киселина и избрани прицелни протеинови структури.**

Target protein	Apigenin	Betulinic acid	Maslinic acid
АКТ	-6.5 kcal/M; 17.4 $\mu\text{M}$	-7.1 kcal/M; 6.3 $\mu\text{M}$	-7.6 kcal/M; 2.7 $\mu\text{M}$
С/ЕВР $\alpha$	-5.6 kcal/M; 79.5 $\mu\text{M}$	-6.5 kcal/M; 17.4 $\mu\text{M}$	-6.9 kcal/M; 8.9 $\mu\text{M}$
GLUT4	-7.8 kcal/M; 1.9 $\mu\text{M}$	-7.0 kcal/M; 7.5 $\mu\text{M}$	-7.6 kcal/M; 2.7 $\mu\text{M}$
PI3K	-8.1 kcal/M; 1.2 $\mu\text{M}$	-8.8 kcal/M; 0.4 $\mu\text{M}^*$	-10.4 kcal/M; 0.02 $\mu\text{M}^*$
PPAR $\gamma$	-7.2 kcal/M; 5.4 $\mu\text{M}$	-8.2 kcal/M; 1.0 $\mu\text{M}^*$	-8.8 kcal/M; 0.4 $\mu\text{M}^*$

\* $K_i$  стойности в диапазона от концентрации на третиране (0.25-1  $\mu\text{M}$ ).





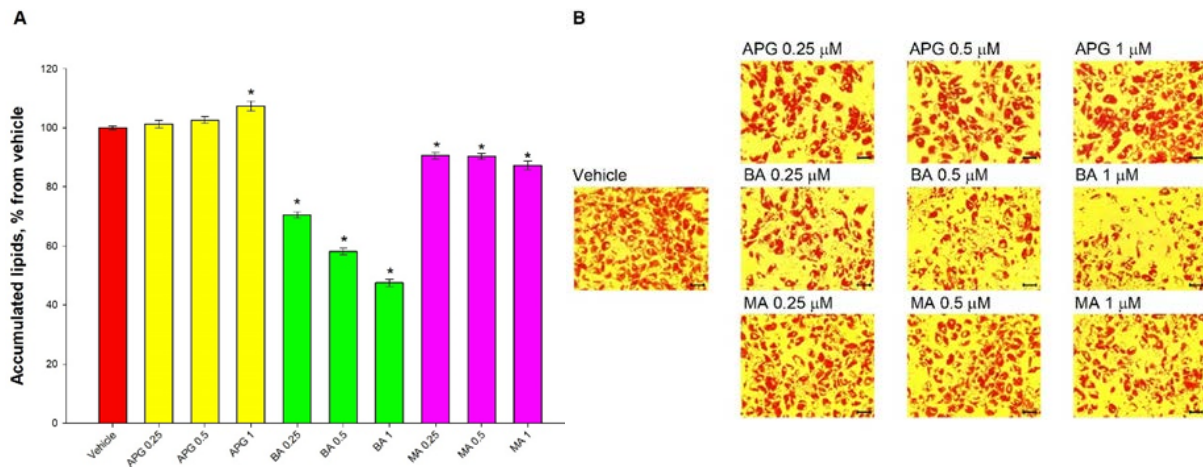
**Фигура 9.** Компютърна докинг симулация на пространствената ориентация на апигенин, бетулинова и маслиненна киселина и местата им на свързване към PI3K и PPAR $\gamma$ . Химични структури на апигенин (APG, **A**), бетулинова (BA, **B**) и маслиненна киселина (MA, **C**). Местата на свързване между аминокиселинните остатъци от съответната протеинова структура (PI3K или PPAR $\gamma$ ) и функционалните групи от избраните природни молекули (APG, BA и MA) са представени както следва: APG-PI3K (**D**), BA-PI3K (**E**), MA-PI3K (**F**), APG-PPAR $\gamma$  (**G**), BA-PPAR $\gamma$  (**H**) и MA-PPAR $\gamma$  (**I**).

3.2. Анализ на вътреклетъчното натрупване на липиди и ефекта върху адиполизата

Анти-адипогенният потенциал на вторичните метаболити от екстракта, показал най-голям потенциал, е оценен чрез липидно оцветяване (Фиг. 10). Представителни

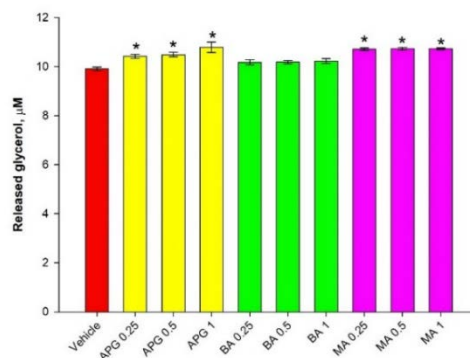


микроскопски снимки от оцветяването на адипоцити (Фиг. 10В) и количествено определяне на натрупаните липиди (Фиг. 10А).



**Фигура 10.** Бетулинова (ВА) и маслинена (МА) киселина потискат значително диференциацията на мастните клетки и натрупването на липиди, в сравнение с апигенин (АРГ). Спектрофотометрично определяне на натрупаните липиди, представено като процент от диференцираната контролна група (А). Представителни микроскопски изображения с увеличение 20× (мащаб 50 μm) от оцветяване с Oil red O на ден 9 от адипоцитната диференциация (В). Данните са представени като средна стойност ± SEM, всяка експериментална група се състои от поне шест успоредни проби в три независими експеримента. \* $p < 0.05$  сравнено с контролната група (Vehicle).

Получените резултати показват умерен ефект върху освободения глицерол, който е индикатор за повлияване на липолизата. Повишаване на този процес е наблюдавано само при третиранията с апигенин и маслинена киселина (Фиг. 11).

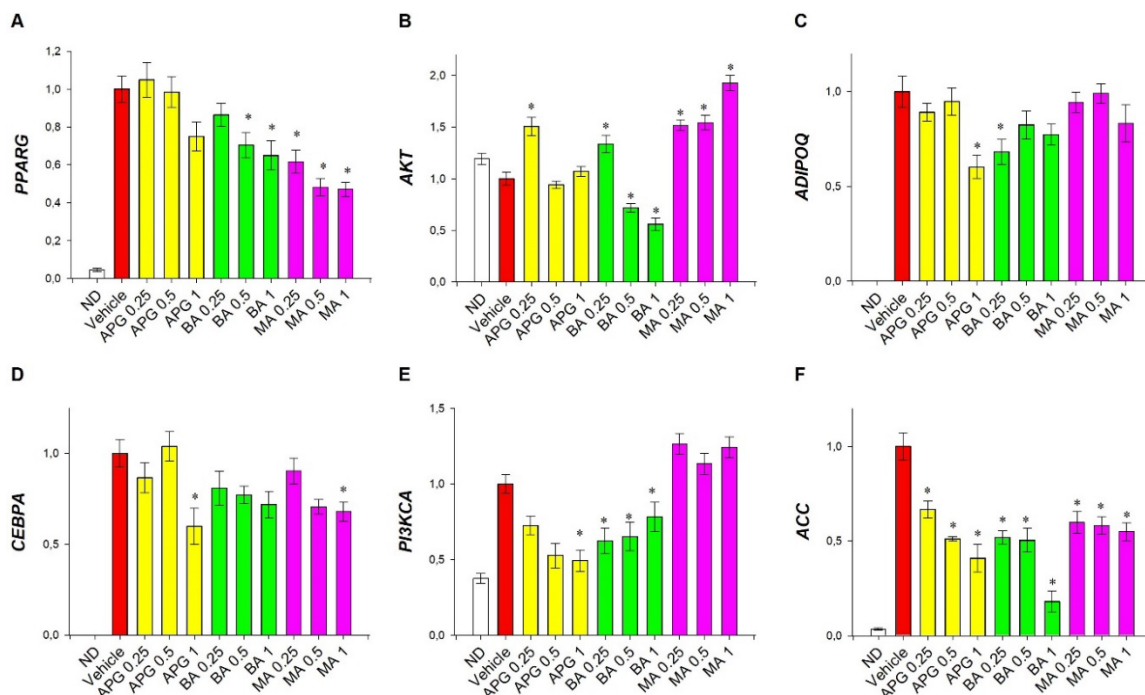


**Фигура 11.** Хидролизата на триглицериди при човешки адипоцити е повишена при третиране с апигенин (АРГ) и маслинена киселина (МА). Концентрация на, отделения в културалната среда, глицерол (μM) на ден 9 от адипоцитната

диференциация. Данните са представени като средна стойност  $\pm$  SEM, всяка експериментална група се състои от поне шест успоредни проби в три независими експеримента. \* $p < 0.05$  сравнено с диференцираната контролна група (Vehicle).

### 3.3. Полимеразна верижна реакция в реално време на иРНК

За изясняване молекулярния механизъм на действие на избраните, от състава на екстракта от хинап вторични метаболити, е извършен RT-qPCR анализ. Генната експресия на ключови регулаторни фактори участващи в диференциацията на мастните клетки е определена при човешки адипоцити третирани с апигенин, бетулинова и маслинена киселина (Фиг. 12). Понижена експресия на *PPARG* (Фиг. 12A) е наблюдавана при третиране с бетулинова и маслинена киселина. Потискане на ниво иРНК на *CEBPA* (Фиг. 12D) е отчетено единствено при най-високите концентрации апигенин и маслинена киселина. Експресията на *ADIPOQ* (Фиг. 12C) е потисната само при най-високата използвана концентрация апигенин, както и при най-ниската концентрация бетулинова киселина. При всички използвани вещества, с повишаване на концентрацията е отчетено намаляване на генната експресия на *ACC* (Фиг. 12F).



**Фигура 12.** Експресията на ключови за адипогенната диференциация гени е потисната в най-голяма степен при третирането с бетулинова киселина (BA), в сравнение с апигенин (APG), и маслинена киселина (MA). Относителна експресия на иРНК, нормализирана спрямо диференцираната контролна група (Vehicle) за следните

гени: *PPARG* (A), *AKT* (B), *ADIPOQ* (C), *CEBPA* (D), *PI3KCA* (E), *ACC* (F) получена при RT-qPCR анализ. *RPL13A* и *TUBB* са използвани като референтни гени. Всяка проба от три независими експеримента е анализирана в три технически повторения. Данните са представени като средна стойност  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  сравнено спрямо диференцираната контролна група.

Последващ анализ на генната експресия на *PI3KCA* и *AKT* е извършен, за да се изясни дали този молекулярен път участва в анти-адипогенния ефект на избраните вторични метаболити. Отчетените промени в генната експресията на *AKT* (Фиг. 12B) при прилагане на бетулинова киселина са двупосочни, а именно – повишаване при 0.25  $\mu$ M и потискане при 0.5 и 1  $\mu$ M. При третиране с маслиненна киселина и при апигенин с 0.25  $\mu$ M експресията на *AKT* (Фиг. 12B) е статистически значимо повишена. В процеса на адипогенна диференциация се повишава експресия на *PI3KCA* (Ortega-Molina et al., 2015). Включването на апигенин и бетулинова киселина към средата на адипоцитите, по време на адипогенезата, понижава експресията на *PI3KCA* (Фиг. 12E).

Въпреки различната посока в наблюдаваното повлияване, всички третирания модулират PI3K/AKT сигнализацията по време на диференциацията на адипоцитите.

#### 3.4. Имуноблот за определяне експресията на протеини

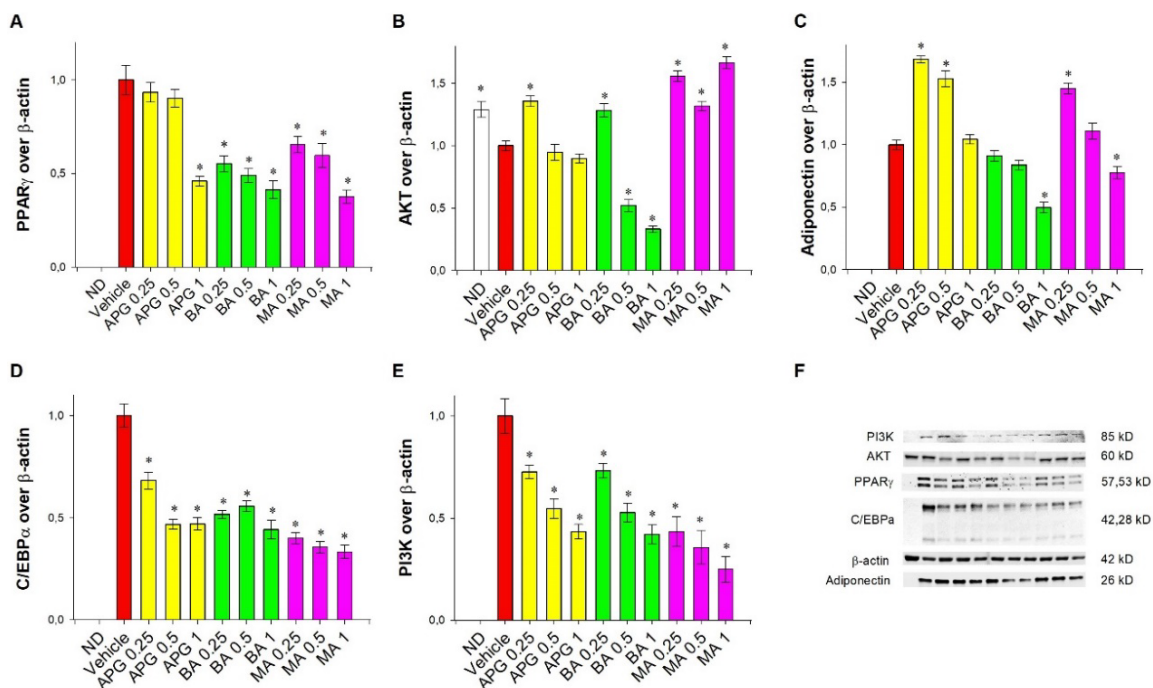
Като допълнение на данните, получени при RT-qPCR анализа, е предприето определяне на протеиновата експресия на избрани регулаторни фактори за адипоцитна диференциация чрез имуноблот (Фиг. 13).

Протеиновите нива на PPAR $\gamma$  (Фиг. 13A) са понижени в следствие на третиране с бетулинова и маслиненна киселина. По отношение на инхибиторния ефект върху експресията на PPAR $\gamma$ , предизвикан от тези природни съединения, настоящите резултати са в съответствие с литературните данни (Ormazabal et al., 2018; Kim et al., 2019), както и данните от докинг анализа, показващ афинитета на бетулинова и маслиненна киселина към структурата на PPAR $\gamma$ . Третирането с апигенин повлиява нивото на PPAR $\gamma$  (Фиг. 13A) само при най-високата използвана концентрация (1  $\mu$ M).

Всички избрани съединения понижават нивата на C/EBP $\alpha$  (Фиг. 13D). Този изразен ефект върху протеиновата експресия на C/EBP $\alpha$  може да се обясни като следствие от отрицателната регулация на PPAR $\gamma$  (Фиг. 13A) при третиране с апигенин, бетулинова и маслиненна киселина. Данните от имуноблот анализа за адипонектин (Фиг. 13C)

разкриват, че неговата експресия е повишена при третиране с апигенин 0.25 и 0.5  $\mu\text{M}$ . Прилагането на бетулинова киселина води до намаляване на протеиновите нива на адипонектин (Фиг. 13С), докато маслинената киселина показва двупосочен ефект (повишаване при третиране с МА 0.25  $\mu\text{M}$  и потискане над 0.5  $\mu\text{M}$ ; Фиг. 13С). Интерес представляват обещаващите резултати, показани от бетулиновата и маслинената киселина при модулиране на всички изследвани протеини, които подкрепят хипотезата за техния значителен потенциал за прилагане в контрола на затлъстяването (Kim et al., 2019; Liou et al., 2019; Torre et al., 2020). При всички изследвани природни молекули, с повишаване на концентрацията е наблюдавано инхибиране на експресията на PI3K (Фиг. 13Е). По отношение на имуноблот анализа, апигенин и бетулинова киселина в концентрации 0.5 и 1  $\mu\text{M}$  понижават експресията на АКТ (Фиг. 13В).

Сред изследваните вторични метаболити в екстракта от хиноп, бетулиновата киселина показва най-изразен анти-адипогенен ефект, повлиявайки молекулярните пътища отговорни за адипоцитната диференциация. На тази база бетулиновата киселина е избрана за *in vivo* валидиране на биологичната ѝ активност при модел на затлъстяване на *C. elegans*.



**Фигура 13.** Протеиновата експресия на изследваните, ключови за диференциацията на мастните клетки, фактори е потисната в най-голяма степен при прилагане на бетулинова киселина (ВА), за ралзика апигенин (АРГ), и маслинената киселина (МА). Имуноблот анализ е извършен за оценка на ефекта върху

нивата на PPAR $\gamma$  (A), АКТ (B), adiponectin (C), C/EBP $\alpha$  (D) P13K (E). Представилтени изображения от блотовете (D). Данните са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от три независими експеримента. \* $p < 0.05$  сравнено с контролна група (Vehicle).

#### 4. Ефект на розмаринова киселина върху адипогенезата и съпътстващото възпаление при *in vitro* модел на затлъстяване

Затлъстяването е комплексно заболяване, при което е нарушена освен физиологията на мастната тъкан също и метаболитната хомеостаза на целия организъм, възпалителния и имунен отговор. Подлежащото хронично възпаление при затлъстяване е най-честата причина за възникване на усложнения и поява на мултиморбидитет (Boutens et al., 2018; Lin et al., 2020). В тази връзка, таргетирането на повече от един молекулярен механизъм е по-рационален отколкото самостоятелното повлияване на адипогенезата или липолизата. За това розмаринова киселина е подбрана като природна молекула с добре известно противовъзпалително действие, с цел да се проследи ефекта ѝ върху диференциацията на човешки адипоцити.

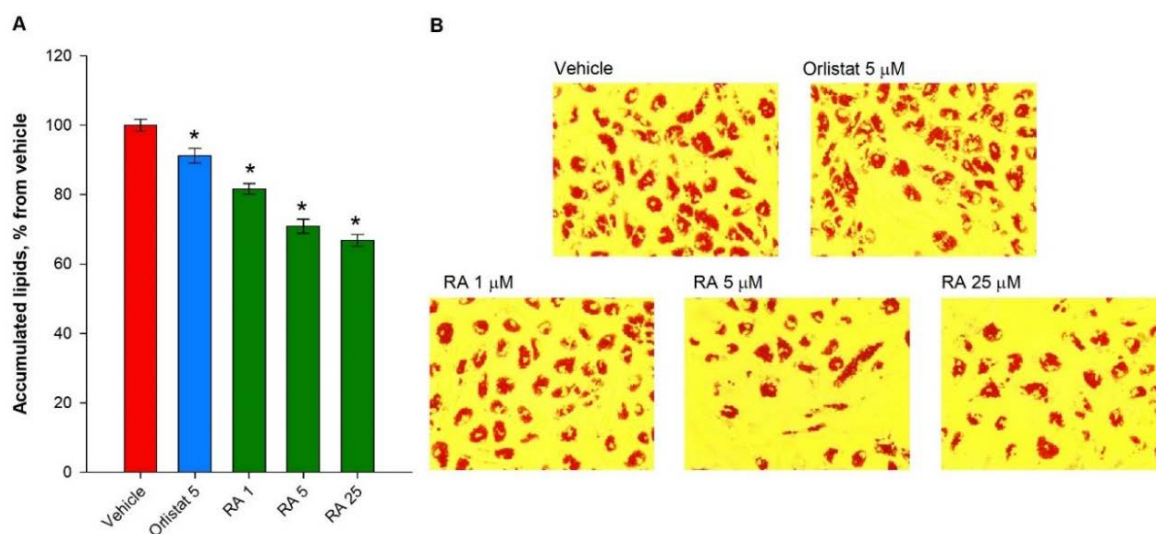
##### 4.1. Определяне на клетъчна жизнеспособност

Резултатите от МТТ анализа показват, че в концентрации до 100  $\mu$ M розмариновата киселина не повлиява клетъчната жизнеспособност при човешки адипоцити, което гарантира липсата на токсичност.

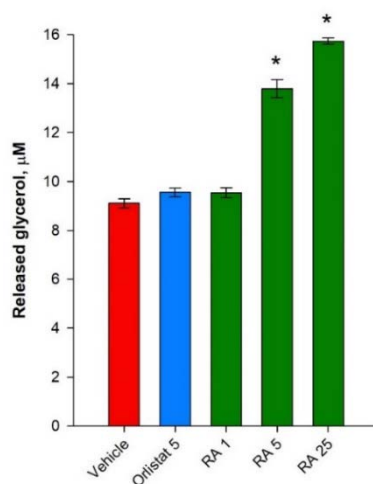
##### 4.2. Анализ на вътреклетъчно натрупване на липиди и ефекта върху адиполизата

За оценка на ефекта на розмариновата киселина върху адипогенезата е използвано ORO оцветяване, а отделения в хранителната среда глицерол е приет за индикатор отразяващ липидната хидролиза. Одобреният за лечение на затлъстяването липазен инхибитор орлистат (Kwon et al., 2022), предотвратява хипертрофията на мастните клетки без директно да повлиява диференциацията им (Gomma et al., 2019; Pai et al., 2019). Въпреки че липидното оцветяване не показва значително потискане на адипогенезата в резултат от третирането с орлистат (Фиг. 14), той е широко използвана контролна субстанция при изследване на анти-обезогенен ефект. Концентрационно-зависимо потискане на диференциацията на мастните клетки е наблюдавано при прилагане на розмаринова киселина спрямо контролната група и в сравнение с орлистат (Фиг. 14). При третирането е повишена базалната липолиза, като с увеличаване на концентрацията се достига

разлика от над 30% в сравнение с диференцираната контрола (Фиг. 15).



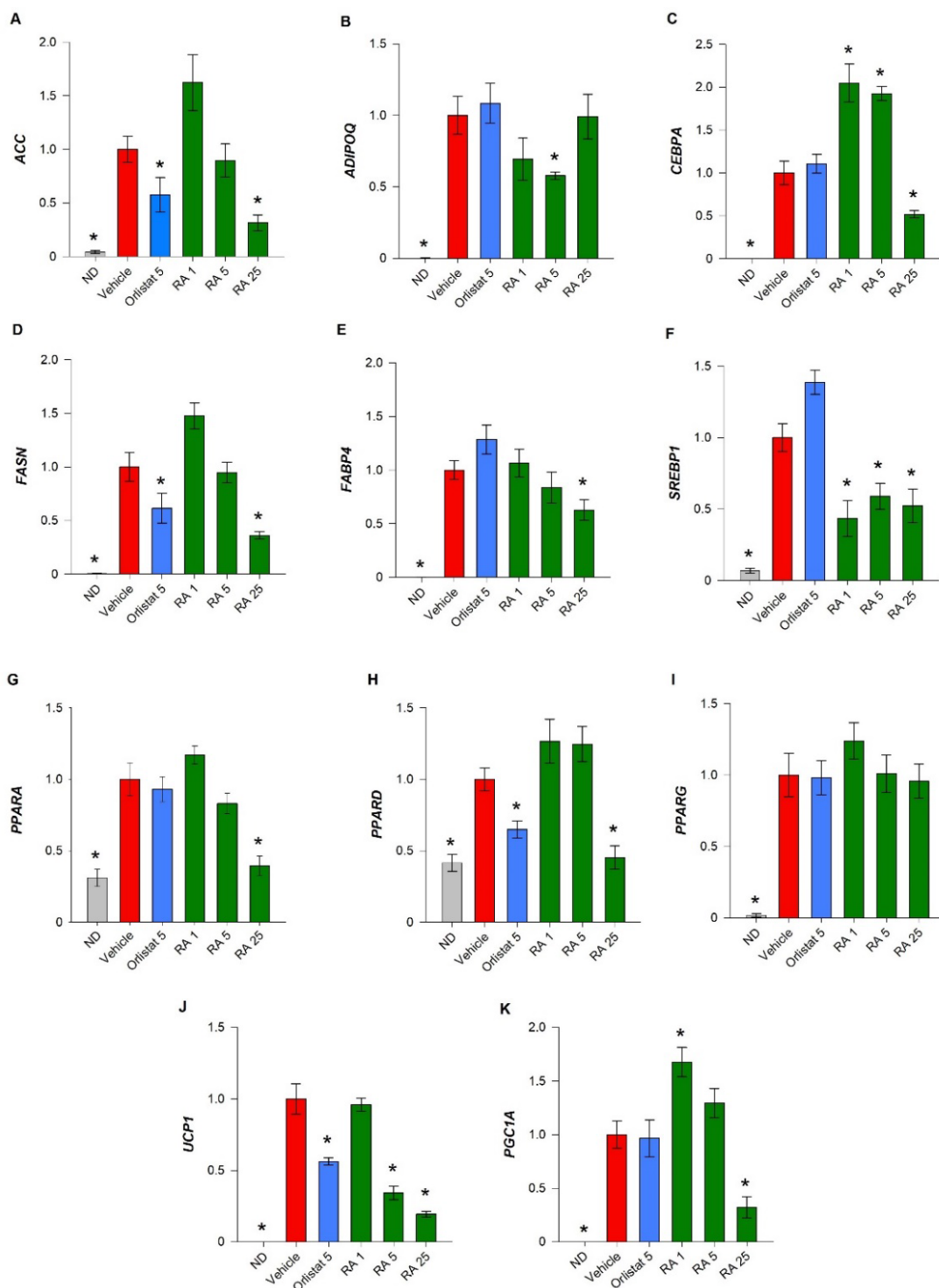
**Фигура 14. Розмаринова киселина (RA) потиска липидното натрупване при човешки адипоцити.** Спектрофотометрично определяне на натрупаните липиди, представено като процент от диференцираната контролна група (Vehicle, **A**). Представителни микроскопски изображения с увеличение 20 $\times$  (мащаб 50  $\mu\text{m}$ ) от оцветяване с Oil red O на ден 9 от адипоцитната диференциация (**B**). Данните са представени като средна стойност  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  сравнено с диференцираната контролна група.



**Фигура 15. Розмаринова киселина (RA) повишава нестимулираната липолиза при човешки адипоцити.** Концентрация на отделения в хранителната среда глицерол ( $\mu\text{M}$ ) на ден 9 от адипоцитната диференциация. Данните са представени като средна стойност  $\pm$  SEM, всяка експериментална група се състои от поне шест успоредни проби в три независими експеримента. \* $p < 0.05$  сравнено с диференцираната контролна група (Vehicle).

### 4.3. Полимеразна верижна реакция в реално време на иРНК

Експресията на ключови за процеса на адипогенеза гени е изследвана чрез RT-qPCR. С повишаване на концентрацията на розмаринова киселина се отчита значително понижение в експресията на *ACC* (Фиг. 16А) и *FASN* (Фиг. 16D), както и *FABP4* (Фиг. 16Е) в сравнение с диференцираната контрола и орлистат.



Фигура 16. Розмаринова киселина (RA) понижава експресията на гените,



**отговорни за адипогенната диференциация.** Относителна експресия на иРНК, нормализирана спрямо диференцираната контролна (Vehicle) група за следните гени: *ACC* (A), *ADIPOQ* (B), *CEBPA* (C), *FASN* (D), *FABP4* (E), *SREBP1* (F), *PPARA* (G), *PPARD* (H), *PPARG* (I), *UCP1* (J) и *PGC1A* (K) получена при RT-qPCR анализ. *RPL13A* и *TUBB* са използвани като референтни гени. Всяка проба от три независими експеримента е анализирана в три технически повторения. Данните са представени като средна стойност ± SEM. \* $p < 0.05$  сравнено спрямо контролната група.

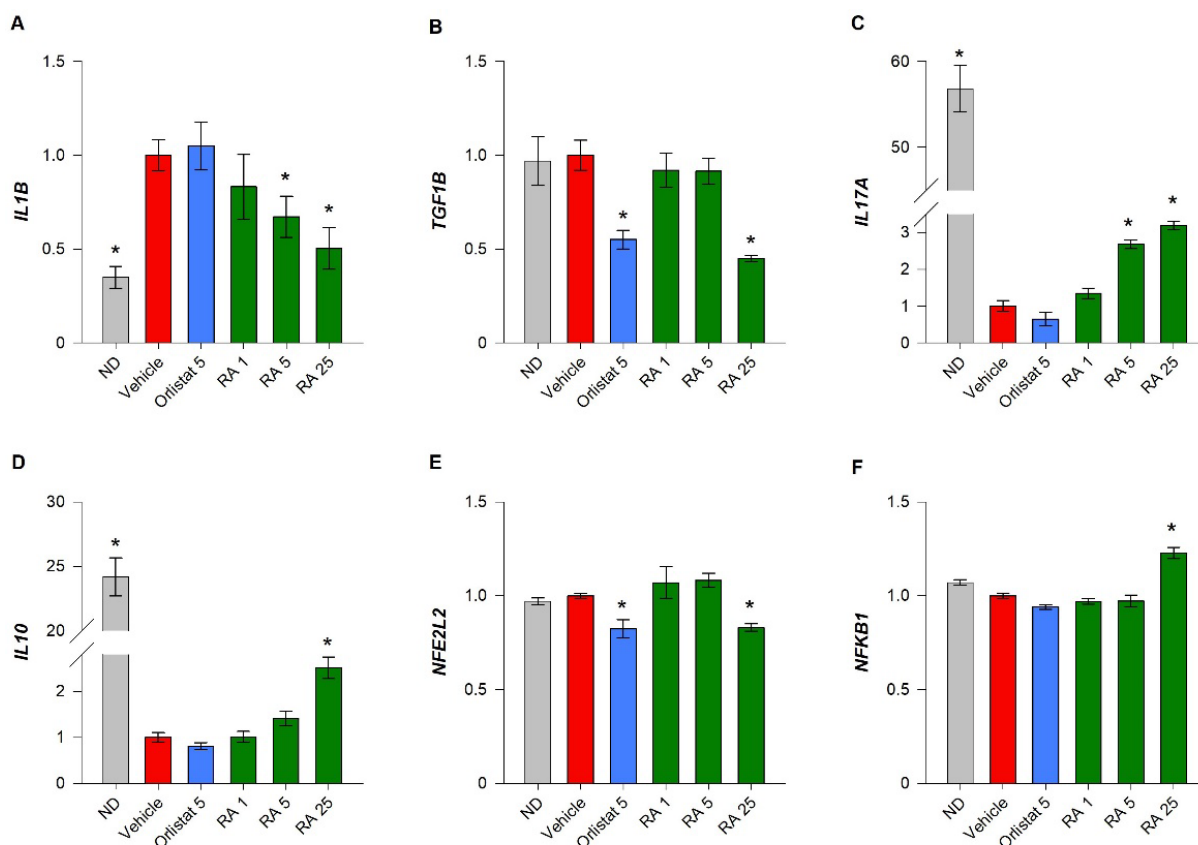
Ефекта на розмариновата киселина върху генната експресия на адипонектин (Фиг. 16B) и *CEBPA* (Фиг. 16C) не следва концентрационна зависимост. Експресията на *ADIPOQ* е потисната значително при групата, третирана с 5  $\mu\text{M}$  розмаринова киселина и слабо повлияна при другите концентрации. За разлика от това, потискане в нивото на *CEBPA* е отчетено при най-високата приложена концентрация – 25  $\mu\text{M}$ , докато 1 и 5  $\mu\text{M}$  предизвикват противоположен ефект. Ключовият за *de novo* липогенезата *SREBP1* (Фиг. 16F) е повишен на транскрипционно ниво при адипоцитите, третирани с орлистат, докато розмариновата киселина значително понижава експресията му.

Допълнително е изследвана експресията на два основни „browning“ гена. Активирането на uncoupling protein 1 (*UCP1*) и peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha (*PGC1A*) е маркер за трансдиференциация на белите мастни клетки към кафяви, т.нар. „browning“ или „покафеняване“. Значимо понижение в отговор на третирането с розмаринова киселина е наблюдавано както за *UCP1* (Фиг. 16I) така и за *PGC1A* (Фиг. 16K), което изключва хипотезата за индуциране на „browning“ при адипоцити в използваните концентрации.

По отношение на противовъзпалителните медиатори при групите диференцирани в присъствие на розмаринова киселина е наблюдавана повишена генна експресия на *Interleukin (IL) 17A* (Фиг. 17C) и *IL10* (Фиг. 17D). Същевременно нивата на гените кодиращи провъзпалителните *IL1B* (Фиг. 17A) и Transforming growth factor beta (*TGF*) *1B* (Фиг. 17B) са значително понижени от приложението на чистата молекула.

В обобщение на данните от RT-qPCR анализа, розмариновата киселина възпрепятства адипогенезата чрез потискане експресията на основни адипогенни и липогенни гени. В допълнение, получените данни предоставят доказателства, че розмариновата киселина понижава свързаното със затлъстяване възпаление, чрез повлияване на автокринния възпалителен отговор при адипоцитите.





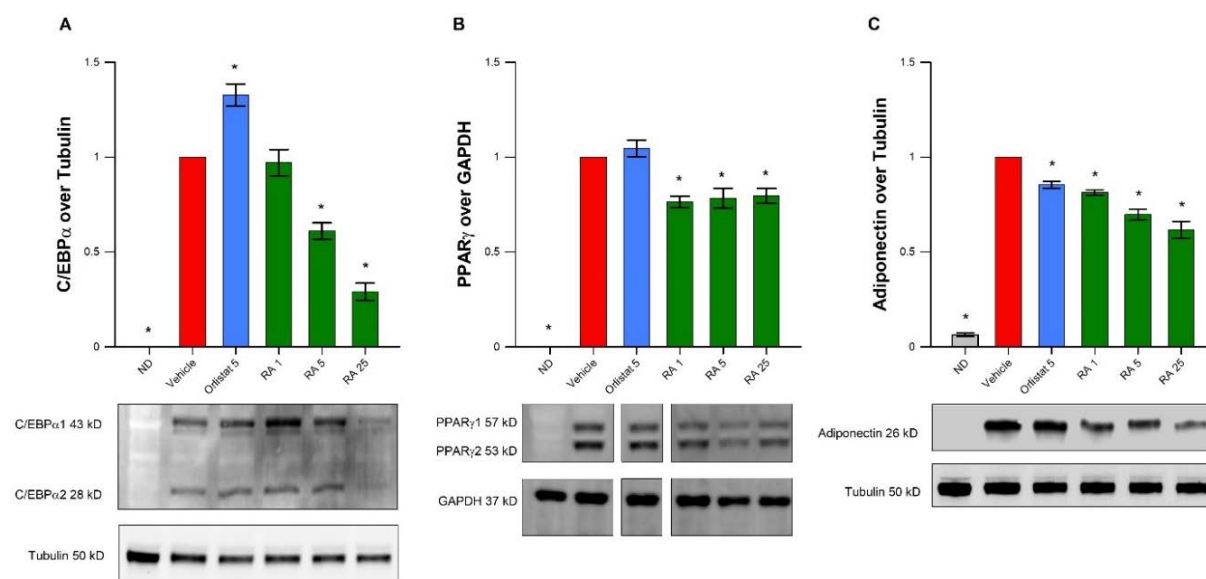
**Фигура 17. Розмаринова киселина (RA) повлиява благоприятно възпалителния отговор при адипоцити.** Относителна гена експресия на избрани цитокини: *IL1B* (A), *TGF1B* (B), *IL17A* (C), *IL10* (D), *NFE2L2* (E), *NFKB1* (F). Данните от RT-qPCR анализа са нормализирани спрямо контролата (Vehicle), като *RPL13A* и *TUBB* са използвани като референтни гени. Резултатите за всяка група са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от три независими експеримента с три технически повторения. \* $p < 0.05$  в сравнение с контролната група.

#### 4.4. Имуноблот за определяне експресията на протеини

Промени в протеиновите нивата на C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$  и адипонектин предизвикани от приложението на розмаринова киселина са отчетени чрез имуноблот (Фиг. 18). Данните от имуноблот анализа показват значително понижение на нивото на C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$  (Фиг. 18A,B) и адипонектин (Фиг. 18C) при групите третирани с розмаринова киселина спрямо орлистат и контролната група. Следователно, тези съществени за адипоцитната диференциация регулатори, служат за прицелни протеинови структури за действието на розмаринова киселина върху мастните клетки.

В обобщение, получените данни разкриват анти-адипогенния потенциал на

розмариновата киселина. Изразеното въздействие на тази природна молекула върху процесите на адипогенеза и адиполиза се допълва от благоприятното повлияване на възпалителния профил на човешките адипоцити.



**Фигура 18.** Розмаринова киселина (RA) потиска протеиновата експресия на C/EBPα, PPARγ и адипонектин при човешки адипоцити. Имуноблот анализ е извършен за оценка на ефекта върху нивата на C/EBPα (A), PPARγ (B) и адипонектин (C). Tubulin или GAPDH са използвани при нормализиране като референтни протеини. Данните са представени като средна стойност ± SEM от три независими експеримента. \*p<0.05 сравнено с диференцираната контролна група (Vehicle).

## 5. *Ин vivo* валидиране на липидо-понижаващия ефект на бетулинова киселина и определяне на молекулярния механизъм на действие при *C. elegans*

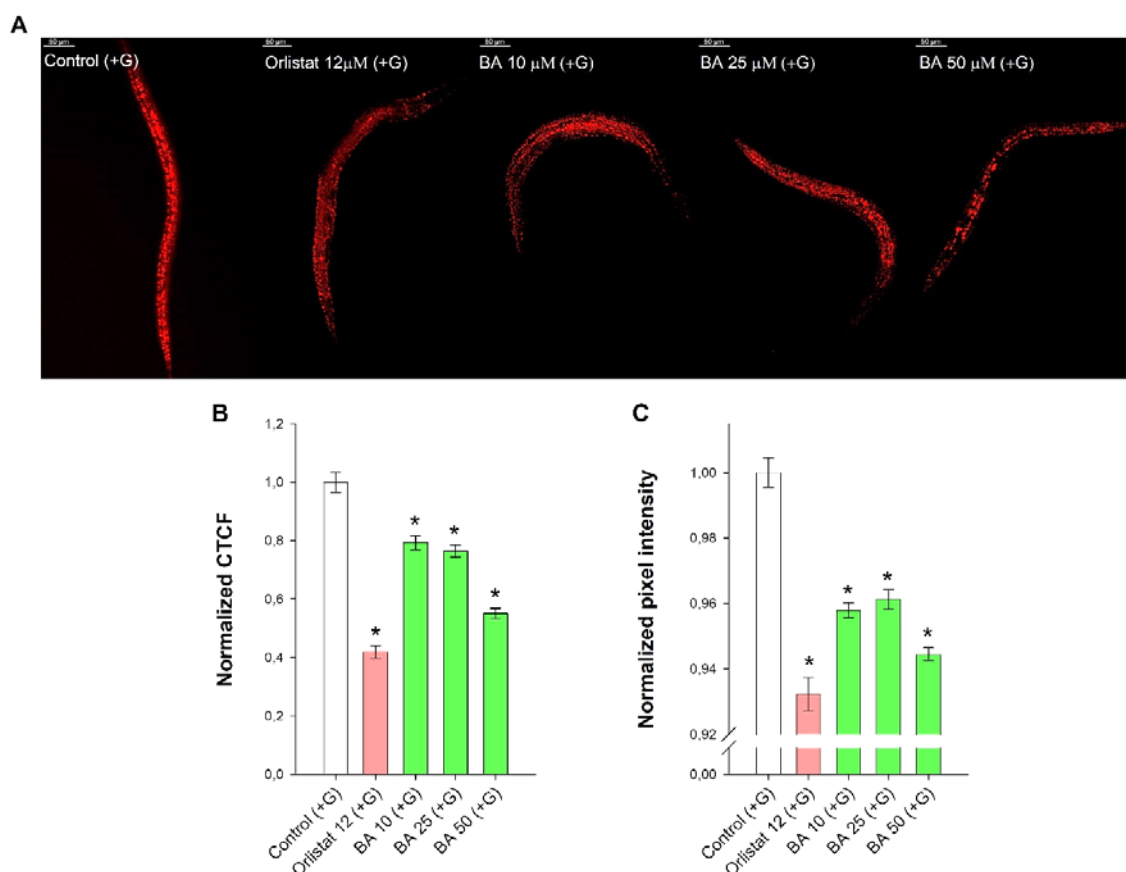
Обещаващата биологична активност, която е отчетена при приложение на бетулинова киселина в *ин vitro* изследванията на човешки адипоцити и определянето на ключови молекулярни механизми на затлъстяването включващи PPARγ и PI3K/AKT сигнализацията, даде основания да се продължи с нейното проучване в *ин vivo* експеримент.

### 5.1. Оценка на жизнеността на нематодите и фенотипни анализи

Резултатите от извършените експерименти показват че използваните концентрации бетулинова киселина (10, 25 и 50 μM) и орлистат (12 μM) не повлияват жизнеността и изследваните фенотипни параметри - двигателна активност, репродуктивен капацитет и продължителност на живота.

## 5.2. Оцветяване на натрупаните липиди

В сравнение с хората, при *C. elegans* няма мастни клетки. Липидните депа се намират в червата и хиподермата на нематода под формата на т.нар. „липидни капки“ (от англ. lipid droplets; Yue et al., 2021a). Резултатите от липидното оцветяване на нематодите третирани с бетулинова киселина 10, 25 и 50  $\mu\text{M}$  показват статистически значимо понижение при ORO (Фиг. 19C) и NR (Фиг. 19B), което не надвишава ефекта, получен от използваната контрола-орлистат, (Фиг. 19B,C).



**Фигура 19.** Бетулинова киселина (BA) потиска липидното натрупване, предизвиканото от включването на 2% глюкоза в средата (+G) при *C. elegans*. Представителни конфокални микроскопски изображения с увеличение 20x (машаб 50  $\mu\text{m}$ ) от оцветяване с Nile red (A). Количествено представяне на интензитета на флуоресценция отчетен при оцветяване на липиди с Nile red като нормализирана стойност за corrected total cell fluorescence (CTCF), брой нематоти  $n = 70-80$  за група (B). Количествено представяне на интензитета отчетен при оцветяване на липиди с Oil red O като нормализирана стойност за pixel intensity, брой нематоти  $n = 30-40$  за група (C). Данните са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от три независими експеримента. \* $p < 0.05$  сравнено с контролната група (Control +G).

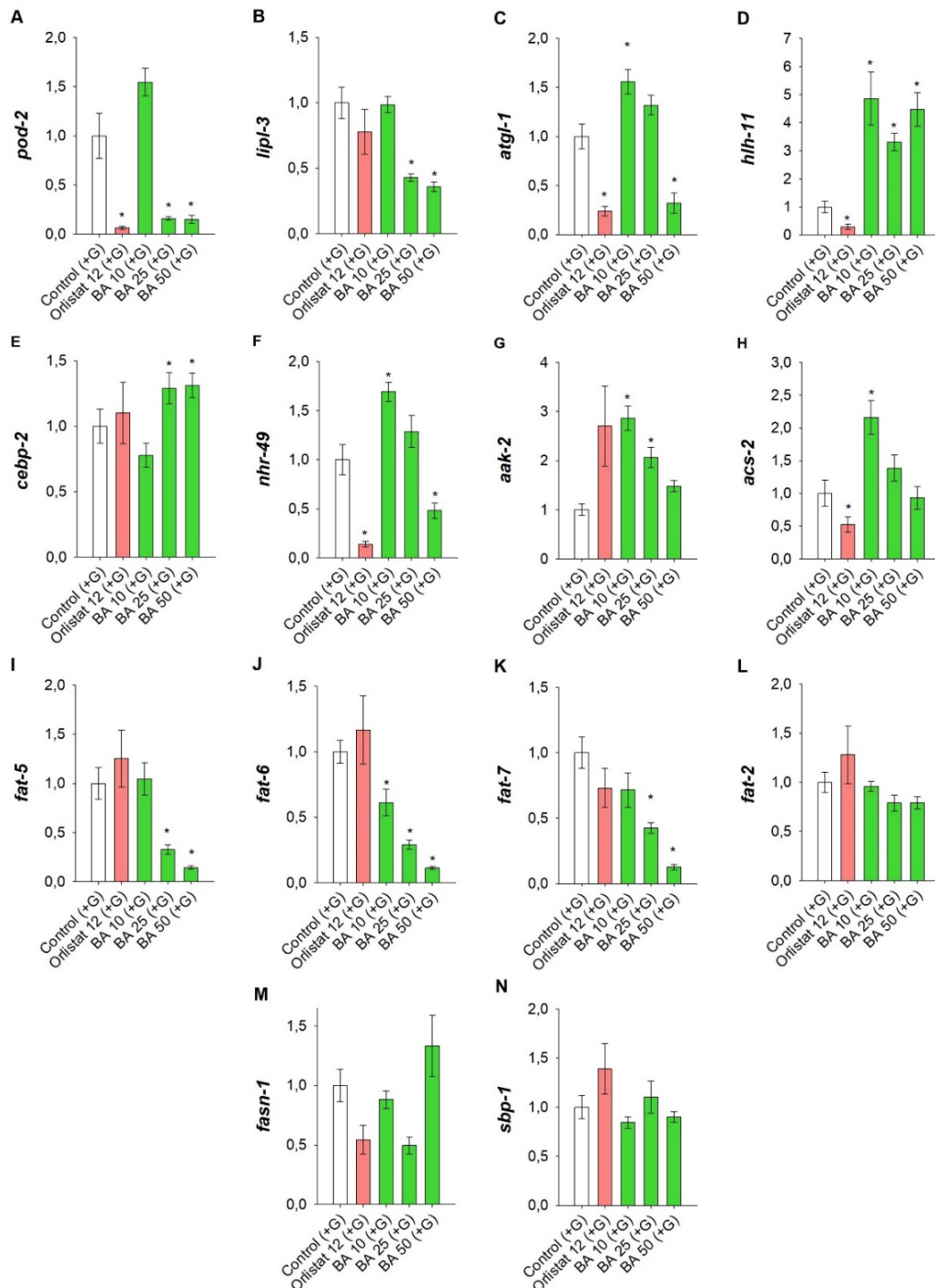
Резултатите от оцветяването на липидите потвърждава потенциала на бетулиновата киселина като природно съединение, повлияващо глюкозо-предизвиканото натрупване на липиди при *C. elegans*. Проведен е последващ анализ на експресията на ключови за липидния метаболизъм гени с цел определяне на молекулярния механизъм на действие на бетулинова киселина при *in vivo* модел на затлъстяване.

### 5.3. Полимеразна верижна реакция в реално време на иРНК и микроРНКи

В липидния метаболизъм на *C. elegans* участват разнообразни и строго регулирани комплексни процеси. В настоящото проучване е изследвана експресията на ключови за липидната хомеостаза транскрипционни фактори като, *sbp-1* и хомолага на човешките C/EBPs – *cebp-2*. В допълнение е изследван и функционалният хомолог на човешките PPARs – nuclear hormone receptor 49 (*nhr-49*). Интересното е да се отбележи, че този транскрипционен фактор стимулира два различни аспекта от мастната обмяна в нематода – липогенеза и  $\beta$ -окисление (Wan et al., 2022). В допълнение, участието на *nhr-49* в липогенезата се състои в повишаването на експресията някои от десатуразите fatty acid desaturases (*fat-2*, -5, -6 и -7), които са специфични за нематода ензими, участващи в *de novo* липогенезата (Ow et al., 2021). Като ортолог на човешките C/EBPs при *C. elegans* – *cebp-2* (Xu et al., 2015) също активира ензимите, участващи в десатурацията на мастните киселини. Друг ключов за липидната биогенеза транскрипционен фактор е ортологът на човешкия SREBP, *sbp-1*, който регулира синтеза на мастни киселини чрез гореспоменатите десатурази. В допълнение, *sbp-1* директно активира, участващите в *de novo* липогенезата ензими – *pod-2* (хомолог на ACC) и *fasn-1* (Yue et al., 2021a). В допълнение е изследвана е експресията на съществения за липидния катаболизъм helix loop helix-11 (*hlh-11*). Споменатият транскрипционен фактор инхибира липидния катаболизъм при наличие на достатъчно хранителни ресурси чрез повлияване на adipose triglyceride lipase (*atgl-1*), лизозомална липаза (*lipl-3*), хидролизираща липидните капки до мастни киселини, и acyl-CoA synthetase (*acs-2*), участваща в  $\beta$ -окислението. Проследена е и относителната експресия на *aak-2* като ортолог на AMPK, за да се установи дали участва в механизма на действие на бетулиновата киселина (Li et al., 2020a).

Бетулиновата киселина значително намалява стимулираното от глюкозата натрупване на липиди при нематодите (Фиг. 20). При най-ниската приложена

концентрация – 10  $\mu\text{M}$  се повишава експресията на *aak-2* (Фиг. 20G) и *acs-2* (Фиг. 20H). Интригуващ е резултата за експресията на *nhr-49* (Фиг. 20F), тъй като бетулиновата киселина в концентрация 10  $\mu\text{M}$  значително повишава експресията му, докато 50  $\mu\text{M}$  значително я потиска.



**Фигура 20.** Бетулинова киселина (BA) повлиява експресията на ключови за липидния метаболизъм гени при *C. elegans*. Относителната експресия на иРНК,

нормализирана спрямо контролна група за следните гени: *pod-2* (A), *lipl-3* (B), *atgl-1* (C), *hlh-11* (D), *cebp-2* (E), *nhr-49* (F), *aak-2* (G), *acs-2* (H), *fat-5* (I), *fat-6* (J), *fat-7* (K), *fat-2* (L), *fasn-1* (M) и *sbp-1* (N), получена при RT-qPCR анализ. Всяка проба от три независими експеримента е анализирана в три технически повторения. Данните са представени като средна стойност  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  сравнено спрямо контролната група (Control +G).

Подобен двуфазен отговор на транскрипционно ниво за най-високата и най-ниската приложена концентрация бетулинова киселина, се наблюдава и при *atgl-1* (Фиг. 20C). Третирането с 25 и 50  $\mu$ M значително понижава експресията на ензимите, участващи в липогенезата (*fat-5*, *fat-6* и *fat-7*, Фиг. 20I-K) и *pod-2* (Фиг. 20A), докато експресията на *cebp-2* (Фиг. 20E) е повишена.

От друга страна, повишаване в експресията на *hlh-11* (Фиг. 20D) е отчетено при всички приложени концентрации бетулинова киселина. Статистически значимо повлияване на транскрипционно ниво не е отчетено при следните гени *sbp-1*, *fat-2* и *fasn-1* (Фиг. 20L-N).

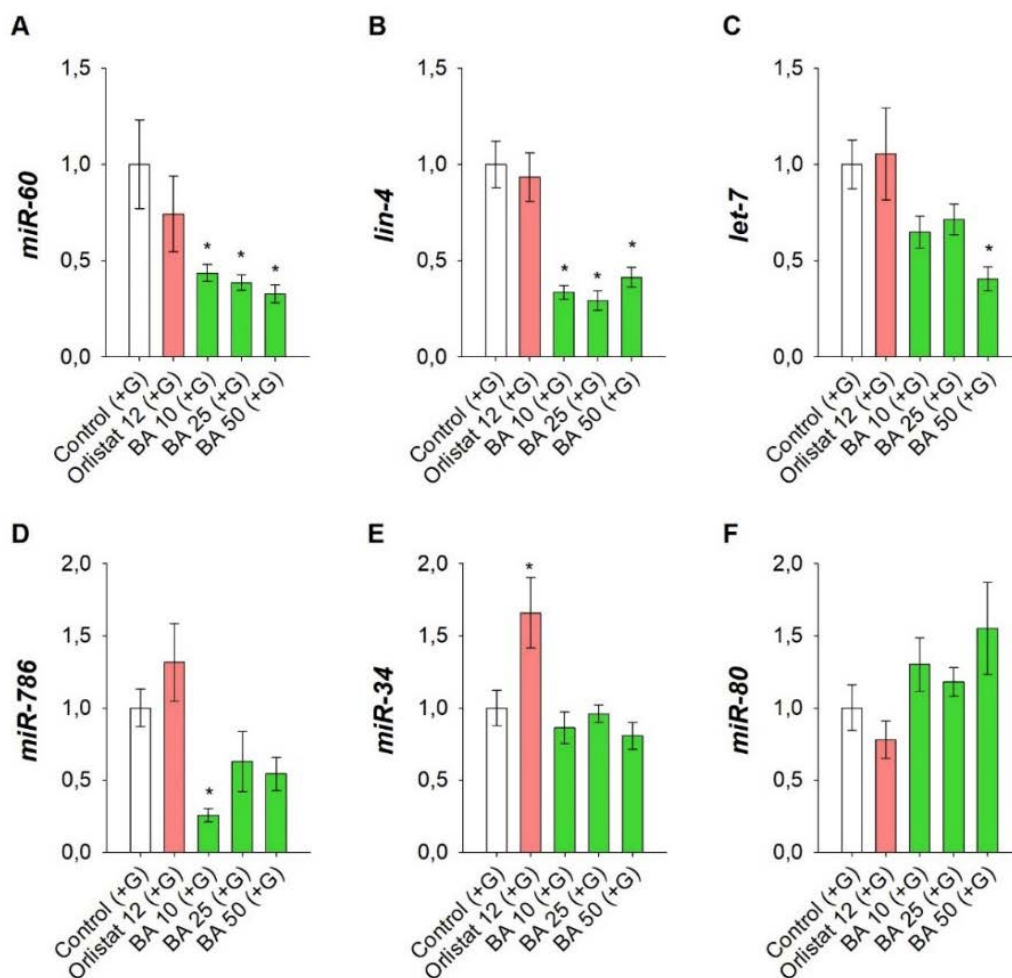
Третирането с орлистат значително потиска генната експресия на *pod-2*, *atgl-1*, *hlh-11*, *nhr-49* и *acs-2* (Фиг. 20), докато *lipl-3*, *cebp-2*, *aak-2*, *fat-5*, *fat-6*, *fat-7*, *fat-2*, *fasn-1* и *sbp-1* не са повлияни (Фиг. 20).

Съществената транскрипционна промяна при някои от избраните гени сочи че както бетулиновата киселина, така и орлистат повлияват липидната обмяна при *C. elegans*. Последващ RT-qPCR анализ на избрани микроРНК е проведен, за да се разкрие комплексния посттранскрипционен контрол при третирането с бетулинова киселина и орлистат на нематоди, в чиято хранителна среда е включена глюкоза.

Третирането с бетулинова киселина 10, 25 и 50  $\mu$ M предизвиква дозо-зависимо понижение на експресията на *miR-60* (Фиг. 21A). В настоящото проучване, експресията на *lin-4* също е понижена (Фиг. 21B). Експресията на *miR-786* (Фиг. 21D) е потисната само при третирането с 10  $\mu$ M, докато експресията на *let-7* (Фиг. 21C) е понижена само при третирането с 50  $\mu$ M. Сред изследваните микроРНК, *miR-34* и *miR-80* не са повлияни при третиране с бетулинова киселина (Фиг. 21E,F). Орлистат (12  $\mu$ M) повишава значително експресията само на *miR-34* (Фиг. 21E), докато при *miR-60*, *lin-4*, *let-7*, *miR-786*, и *miR-80* не е отчетено значимо повлияване (Фиг. 21).

Компютърно-подпомогнатото определяне на прицелните за микроРНК и РНК, е съществено за изясняване на биологичната им роля. На база на забелязаното значително

повлияване на профили на експресия при *miR-60* и *lin-4* в следствие на третиране с бетулинова киселина, посредством биоинформатичен анализ са изведени предполагаемите им таргетни иРНК, чрез използване на базата данни – TargetScanWorm (Jan et al., 2011). Сред изведените прицелни иРНК (8mer+1) за *miR-60* – aquaporin-7 (*aqp-7*), *nhr-34* и *acs-4* са пряко свързани с липидния метаболизъм и е възможно да участват в механизма на действие на бетулиновата киселина. Измежду предложените таргети на *lin-4*, два от тях (*hlh-30* и *mediator-15*, *mdt-15*) участват в липидния метаболизъм (O'Rourke et al., 2013). Идентифицираните таргети на повлияните микроРНКи са потенциални участници в молекулярния механизъм на действие на бетулиновата киселина.



**Фигура 21.** Бетулинова киселина (BA) потиска експресията на *miR-60* и *lin-4* при *C. elegans*. Относителната експресия на микроРНКи, нормализирани спрямо контролна група за: *mir-60* (A), *lin-4* (B), *let-7* (C), *miR-786* (D), *miR-34* (E) и *miR-80* (F) получена при RT-qPCR анализ. Всяка проба от три независими експеримента е анализирана в три технически повторения. Данните са представени като средна стойност  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  сравнено спрямо контролната група.

В заключение, сред изследваните растителни екстракти и природни молекули, най-изразен анти-адипогенен ефект показват екстракта от хинап и бетулиновата киселина, които на етап клетъчна линия потискат експресията на ключови фактори в диференциацията на мастните клетки. Последващият експеримент на организмово ниво потвърждава, че бетулиновата киселина повлиява различни аспекти на липидния метаболизъм в глюкозо-предизвикания модел на затлъстяване при *C. elegans*. Резултатите от анализа на генната експресия показват, че транскрипционният фактор *nhr-49* играе съществена роля в механизма на действие на бетулиновата киселина. При третирането в концентрация 10  $\mu\text{M}$  се повишава експресията *nhr-49*, което корелира с отчетената експресия на ензимите, свързани с хидролиза на липидите (*atgl-1*) и последващото им окисление (*acs-2* и *aak-2*), докато при използването на 50  $\mu\text{M}$  бетулинова киселина се наблюдава понижаване на експресията на *nhr-49* и на липогенните гени (*pod-2*, *fat-5*, -6 и -7), които са регулирани от този транскрипционен фактор.



## VI. ДИСКУСИЯ

В работата по настоящия дисертационен труд е приложен комбинативен подход между молекулярна фармакология и етнофармакология с цел идентифициране на растителни вторични метаболити с потенциал за благоприятно повлияване на затлъстяването и определяне техния молекулярен механизъм на действие.

По-нататък са коментирани резултатите от настоящия труд, обособени в няколко раздела спрямо логичната и хронологична последователност на извършването им.

### 1. Екстракт от хинап проявява най-изразена анти-адипогенна активност при *in vitro* модел на затлъстяване

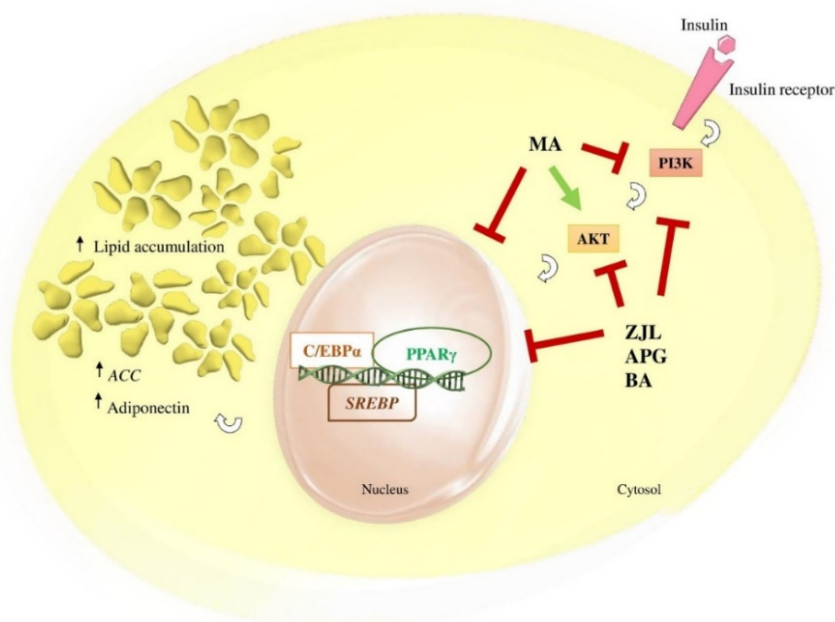
Въз основа на избрания в настоящия труд подход за повлияване на патологичните механизми водещи до затлъстяване, а именно, чрез потискане на адипогенезата и стимулиране на адиполизата, за работа на следващия етап е избран екстракта от листна маса от хинап. Той показва най-слабо потискане на адиполизата и повлиява експресията на всички изследвани участници в адипогенезата – P13K/AKT сигналния път и последващо инхибиране на PPAR $\gamma$  и C/EBP $\alpha$ . На база на извършеното метаболитно профилиране на този екстракт и извършена обстойна литературна справка за химичния му състав, са избрани апигенин, бетулинова и маслиненна киселина, чиито анти-адипогенен се изследва в утвърдената *in vitro* моделна система на затлъстяване.

### 2. Бетулиновата киселина показва най-обещаващо инхибиране на липидното натрупване на клетъчно ниво

Известно е, че растителните вторични метаболити имат множество благоприятни ефекти върху здравословното състояние (Atanasov et al., 2021), включително и повлияване на затлъстяването и съпътстващите го усложнения (Bhardwaj et al., 2021; Li et al., 2022; Martel et al., 2017).

Въз основа на взаимовръзката между активирания P13K/AKT сигнален път и повишената експресия на PPAR $\gamma$  и C/EBP $\alpha$  по време на адипогенезата (Lopez-Guadamillas et al., 2016; Min et al., 2013; Nagai et al., 2018; Ortega-Molina et al., 2015), резултатите предлагат участието на тези медиатори в механизма на действие апигенин, бетулинова и маслиненна киселина. Необходими са допълнителни изследвания, за да се определи дали избраните съединения директно взаимодействат с PPAR $\gamma$  или C/EBP $\alpha$ . По отношение ролята на P13K/AKT в инсулиновата сигнализация (Foukas et al., 2013; Mandl

et al., 2020; Ortega-Molina et al., 2015), понижението в протеиновите нива на PI3K при всички експериментални третирания модулирането на този сигнален път при всички третирания. Въпреки съществената роля на инсулиновата сигнализация за запазване на инсулиновата чувствителност, се съобщава, че инхибирането на PI3K има благоприятен метаболитен ефект по време на адипогенна диференциация (Foukas et al., 2013; Ortega-Molina et al., 2015). Обобщаването на резултатите от RT-qPCR и имуноблот анализите сочат, че инхибирането на PI3K/АКТ сигналния път и последващото понижаване на PPAR $\gamma$  и С/ЕВР $\alpha$  е основният механизъм, участващ в ефекта както на екстракта от хинап, така и на апигенин, бетулинова и маслинена киселина върху функцията на адипоцитите (Фиг. 22).



**Фигура 22.** Екстрактът от хинап (ZJL), апигенин (APG), бетулинова (BA) и маслинена (MA) киселина модулират PI3K/АКТ сигналния път и поискат ключови за адипоцитната диференциация транскрипционни фактори. Апигенин и бетулинова киселина показат ефект на върху генната експресия на изследваните сигнални пътища, сходен с този наблюдаван при прилагането на екстракта от хинап. Интересното е, че маслинената киселина инхибира PI3K, но повишава АКТ, което показва, че маслинената киселина модулира сигнализацията PI3K/АКТ чрез механизъм различен от този на бетулиновата киселина, апигенин и екстракта от хинап.

Резултатите от извършените анализи предоставят доказателства за анти-адипогенния потенциал и молекулярния механизъм на действие на екстракта от хинап и

изследваните природни молекули – апигенин, бетулинова и маслинена киселина при *in vitro* модел на човешки адипоцити. Сред избраните вторични метаболити от екстракта от хинап, при бетулиновата киселина е отчетен най-висок потенциал за повлияване процеса на адипогенна диференциация *in vitro*, което дава основание за последващото ѝ проучване в *in vivo* модел на затлъстяване.

3. Розмариновата киселина показва анти-адипогенен потенциал и ограничава възпалителния отговор при човешки адипоцити

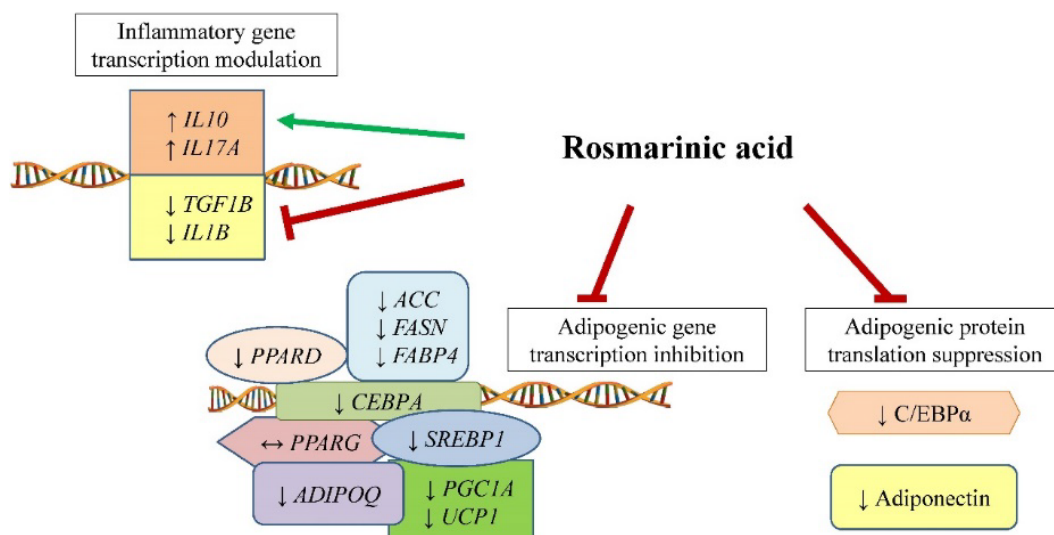
Третирането на човешки адипоцити с розмаринова киселина потиска натрупването на липиди, повишава липолизата и потиска експресията на ключови за диференциацията на мастните клетки гени.

По отношение на адипогенните транскрипционни фактори, засегнати в настоящия труд, резултатите от имуноблот анализа, сочат че розмариновата киселина потиска протеиновата експресия на *C/EBP $\alpha$* , което показва, че този транскрипционен фактор е отговорен за биологичния отговор отчетен като резултат от третирането. Значимото понижаване на експресията на *SREBP1* е в съответствие с предходното твърдение, тъй като този фактор е пряко свързан с *CEPBA* по време на адипоцитната диференциация. В допълнение, инхибирането на регулираните от *SREBP1* сигнални пътища в адипоцити е свързано с намалена продукция на tumor necrosis factor- $\alpha$ , IL-6, адипонектин и резистин (Okuno et al., 2018). Правейки паралел с докладваните в литературата взаимовръзки, наблюдаваното понижаване на експресията на *CEPBA* и *SREBP1*, вероятно води до потискането на експресията на адипонектин и *FABP4*. В съответствие с потиснатата адипогенеза, при третирането с розмаринова киселина е отчетено и понижаване в експресията на *ACC* и *FASN*, които са основни за *de novo* липогенезата ензими, намиращи се под пряк контрол от *SREBP1* (Boutens et al., 2018; Lin et al., 2020; Okuno et al., 2018).

Предходни проучвания за ефекта на розмариновата киселина сочат, че модулирането на сигнални пътища, свързани с възпалителния отговор и оксидативния стрес са сред прицелните молекулярни мишени на тази природна молекула. Такива сигнални пътища са NF $\kappa$ B/MAPK (Joardar et al., 2019), AMPK/TGF- $\beta$  (Yang et al., 2012; Zhang et al., 2018b) и NRF2/heme oxygenase 1 (HO-1; Gerogianni et al., 2018; Joardar et al., 2019). Противовъзпалителната активност на розмариновата киселина, посредством повлияване на NRF2 и NF $\kappa$ B, е демонстрирана при клетъчни типове от различни тъкани

сред които неврони (Gerogianni et al., 2018; Rong et al., 2018), нефрони (Joardar et al., 2019) и кератиноцити (Georgiev et al., 2012).

В обобщение на получените резултати, че розмариновата киселина потиска генната експресия на ключови адипогенни фактори, както и на последващия синтез на протеини при C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$  и адипонектин (Фиг. 23), което води до наблюдавания анти-адипогенен ефект. Съдейки по неповлияната експресия на *UCP1* и *PGC1A*, в настоящото проучване не може да се твърди, че наблюдаваното понижаване в натрупването на липиди е в следствие „покафеняване“ на мастната тъкан. Благоприятното повлияване на цитокини и ключови за възпалителните пътища транскрипционни фактори е един от механизмите чрез който розмариновата киселина проявява своя анти-адипогенен ефект. Получените резултати са в подкрепа че наблюдаваното понижаване в натрупването на липиди при третиране с розмаринова киселина се дължи както на потиснатата диференциация на мастните клетки, така и на противовъзпалително действие на изследваната природна молекула. Сред проучените в настоящия труд регулаторни фактори най-значително повлияване е установено за C/EBP $\alpha$ , на базата на което може да се предложи, че повлияването на този транскрипционен фактор е ключов механизъм в анти-адипогенния ефект на розмариновата киселина. В допълнение, при третирането е наблюдавано противовъзпалително действие на розмариновата киселина чрез модулирането на сигналния път TGF- $\beta$ /IL-17A по време на адипогенната диференциация.



**Фигура 23.** Розмариновата киселина проявява анти-адипогенния си ефект чрез потискане на адипогенезата и липогенезата, успоредно с редуциране на възпалителния отговор по време на диференциацията на човешки адипоцити.

#### 4. Бетулинова киселина потиска липидния синтез и стимулира енергоразхода в *in vivo* модел на затлъстяване при *C. elegans*

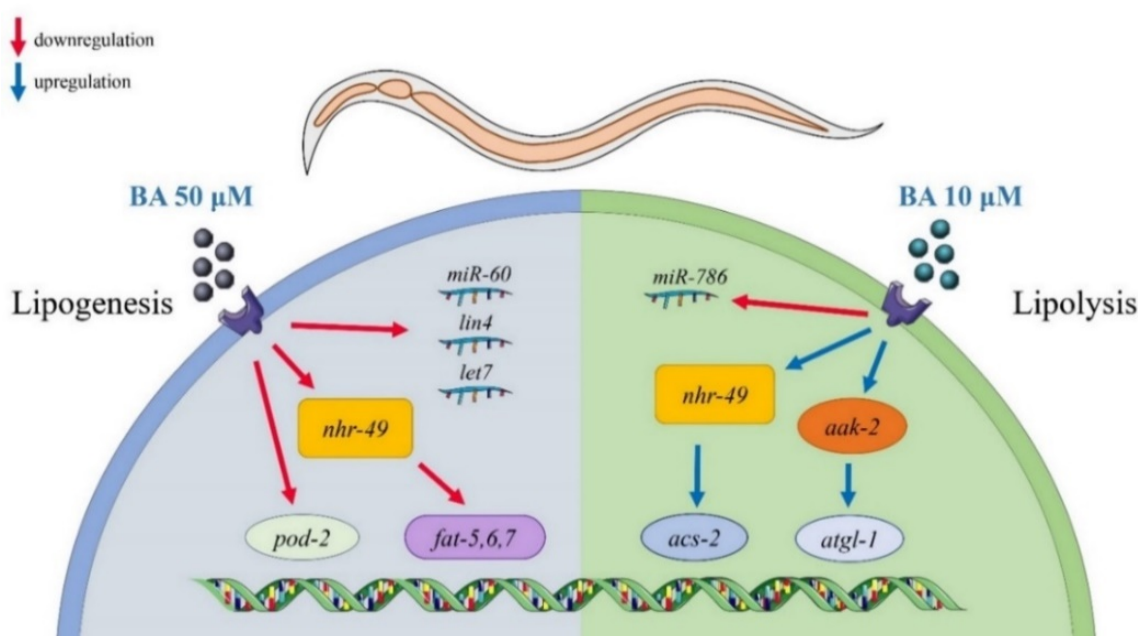
Последният експеримент, включен в настоящата работа, има за цел да потвърди резултатите от избрана въз основа на проведените *in vitro* експерименти, природна молекула в *in vivo* модел на затлъстяване при *C. elegans*. Важно е да се отбележи, че до този момент потенциалът на бетулиновата киселина за повлияване на липидната обмяна не е изследван при *C. elegans* като моделна система на затлъстяване. В настоящия експеримент, като контролна субстанция за понижаване на липидното натрупване е използван орлистат, който е един от одобрените за лечение на затлъстяване медикаменти. Наблюдаваното понижение на натрупаните липиди при третирането с орлистат е в унисон с данните от литературата (Aranaz et al., 2020; Navarro-Herrera et al., 2018; Reboredo et al., 2021). Сходна тенденция е потвърдена и след приема му при миши модели, подложени на високомазнинна диета, заедно с подобрени стойности на серумните липиди (Reboredo et al., 2021; Yi et al., 2021; Yue et al., 2021b; Zakaria et al., 2021).

Бетулиновата киселина е растителен вторичен метаболит, притежаващ ценни имунорегулаторни, противовъзпалителни (Lin et al., 2022) и хепатопротективни (Gu et al., 2019; Zhao et al., 2022) свойства. Извършените фенотипни анализи показват, че бетулиновата киселина не повлиява продължителността на живот, двигателната активност, както и репродуктивния капацитет на *C. elegans*. С покачване на концентрацията бетулинова киселина се наблюдава и статистически значимо потискане на липидните натрупвания при нематодите. Получените данни потвърждават докладвания потенциал на бетулиновата киселина да повлиява благоприятно затлъстяването при *in vitro* (Brusotti et al., 2017; Mohsen et al., 2019) и *in vivo* (Kim et al., 2019; Melo et al., 2009) модели.

Резултатите от количественото определяне на натрупаните липиди сочат, че във всички приложени концентрации, бетулиновата киселина потиска индуцираното от глюкоза натрупване на липиди при нематоди. Въпреки наблюдаваната еднопосочна тенденция по отношение на натрупаните липиди, анализът на генната експресия на *nhr-49* и *atgl-1* предполага участието на различни механизми опосредстващи наблюдавания ефект 10 и 50  $\mu\text{M}$ . Третирането с бетулиновата киселина в концентрация – 10  $\mu\text{M}$  покачва експресията *nhr-49*, *atgl-1*, *acs-2* и *aak-2*, на база на което се предполага повишение на

хидролизата и  $\beta$ -окислението на мазнините. От друга страна, най-високата концентрация бетулинова киселина – 50  $\mu\text{M}$ , изразено потиска едновременно както липидния синтез, така и липолизата, съдейки, по понижаването на експресия на *pod-2*, *nhr-49*, *fat-5*, -6 и -7, както и на липазите – *lipl-3* и *atgl-1*.

Третирането с бетулинова киселина повлиява различни аспекти на липидния метаболизъм при *C. elegans*, в зависимост от приложената концентрация. Транскрипционният фактор *nhr-49* е функционален хомолог на семейството ядрени рецептори – PPARs, чиято изоформа – PPAR $\gamma$  е повлияна в клетъчната моделна система. В обобщение на резултатите е предложен молекулярен механизъм чрез който бетулиновата киселина намалява липидните натрупвания при *C. elegans* (Фиг. 24). При третирането с 10  $\mu\text{M}$  се стимулира хидролизата на липидите и последващото им окисление, докато включването на 50  $\mu\text{M}$  изразено потиска липидния синтез.



**Фигура 24.** Анти-обезогенния механизъм на действие на бетулиновата киселина (ВА) модел на затлъстяване при *C. elegans* се дължи на двуфазно повлияване на експресията на *nhr-49*. Третирането с бетулинова киселина в условия на повишена глюкоза в хранителната среда, предотвратява натрупването на триглицериди в липидните депа на нематодите. Съдейки по увеличената експресия на *nhr-49*, *atgl-1*, *acs-2* и *aak-2* при третирането с 10  $\mu\text{M}$ , се предлага, че в тази концентрация е стимулирана липолизата. За разлика от това, механизмът засегнат при третирането 50  $\mu\text{M}$  е инхибиране на липидния синтез чрез потискане експресията на *pod-2*, *nhr-49* и свързаните с него десатурази – *fat-5*, -6 и -7.

## 5. Заключение и бъдещи насоки

В настоящия дисертационен труд е адаптиран за първи път в България модел на затлъстяване при човешки адипоцити. Извършен е скрининг за повлияване на адипогенезата и липолизата на екстракти от лечебни растения, използвани в билкови комбинации за лечение на метаболитни нарушения, както и на избрани природни съединения. Така структурираната експериментална платформа позволява изследване за анти-адипогенна активност и установяване на молекулярния механизъм на действие на природни молекули. Сред изследваните природни молекули, потенциалът за повлияване на избраните молекулярни сигнални пътища на най-обещаващата е валидиран на организмово ниво при глюкозо-предизвикан модел на затлъстяване при *C. elegans*. Тази *in vivo* моделна система също е въведена за първи път в България в контекста на изследване на сложната мрежа от молекулярни механизми за повлияване на затлъстяването. Резултатите от проведените в настоящия труд експерименти, за първи път предоставят данни за механизма на действие на екстракт от листа на хинап в модел на затлъстяване при човешки адипоцити. Инхибирането на PI3K/AKT сигналния път е идентифициран като основен молекулярен механизъм на ефекта на екстракта от хинап, апигенин и бетулинова киселина върху адипогенезата. Освен това наблюдаваното повлияване на експресията на PPAR $\gamma$  и C/EBP $\alpha$  при третирането с екстракт от хинап и избрани молекули, показва участието на тези транскрипционни фактори в механизма на действие на установения анти-адипогенен ефект. В заключение, е възможно да се твърди, че всички изследвани растителни вторични метаболити (апигенин, бетулинова и маслинана киселини) участват в анти-адипогенния ефект показан при прилагането на екстракта чрез PI3K/AKT сигнализирането, което се явява техен общ молекулярен механизъм. Въпреки това, екстракта от хинап упражнява най-изразен ефект върху намалянето на натрупаните липиди в клетъчния модел. Това обосновава употребата на екстракта като източник на ценни биологично-активни вещества с потенциал за повлияване на липидния метаболизъм.

Сред избраните природни молекули от състава на екстракта от хинап, бетулиновата киселина показва най-изразен анти-адипогенен потенциал, в използвания нисък концентрационен диапазон на третиране. Получените резултати показват че бетулиновата киселина взаимодейства с PI3K/AKT сигналната каскада и модулира PPAR $\gamma$  в модел на затлъстяване при човешки адипоцити. Въз основа на данните от клетъчния модел, може да обобщим, че бетулиновата киселина е най-обещаващата, сред

изследваните в настоящата дисертация, природни молекули, чийто ефект е валидиран на организмово ниво.

Допълнително включената в изследването, розмаринова киселина проявява своя анти-адипогенен ефект чрез инхибиране на ключови за адипогенезата фактори като C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$  и адипонектин. Установеният противовъзпалителен ефект, чрез повлияване на цитокини и ключови за възпалителните пътища транскрипционни фактори е изключително предимство на розмариновата киселина, тъй като повлиява освен адипогенезата и възпалението като усложнение, съпътстващо затлъстяването. Тези резултати показват потенциала на розмариновата киселина като компонент на бъдещи комбинации, изследвани в утвърдената *in vivo* моделната система.

Заключителният експеримент утвърждава потенциала на бетулиновата киселина за повлияване на патологичното липидно натрупване при глюкозо-индуцирано липидно натрупване при *C. elegans*. Независимо от различията в концентрационния отговор на ниво гена експресия, крайният ефект от третирането с бетулинова киселина е изразено намаляване на липидните натрупвания. Освен това, в най-висока използвана концентрация потискането на натрупването на мазнини, доближава ефекта предизвикан от орлистат, което е показателно за потенциала на изследвания терпеноид за приложение в терапията на затлъстяването. Получените резултати от *in vivo* експеримента потвърждават хипотезата, че бетулиновата киселина е природно съединение с потенциал за приложение във фармакотерапевтичния подход за лечение и превенция на затлъстяването.

Резултатите от настоящия труд предоставят детайлна механистична информация за молекулярните пътища, засегнати при третиране с избрани растителни екстракти и чисти природни молекули. След подробен анализ на получените данни, се сформират бъдещи насоки за продължаване на работата в научното направление на молекулярна фармакология на затлъстяване. Екстрактът от хинап, показал най-изразена активност в клетъчната моделна система на затлъстяване, заслужава допълнително разработване, с цел идентифициране на други потенциални биологично-активни вторични метаболити от състава му. Сред изследваните чисти молекули от екстракта от хинап, бетулиновата киселина показва изключителен потенциал за понижаване на липидното натрупване, както при използвания клетъчен модел, така и на организмово ниво. При най-високата използвана концентрация, бетулиновата киселина потиска натрупването на липиди до степен, сравнима с резултатите постигнати при третирането, с използваното референтно



лекарство за лечение на затлъстяване – орлистат. Макар че потенциален синергизъм от хибридна комбинация между орлистат и бетулинова киселина не е потвърден по отношение на редукция на липидното натрупване, обосновано е да се планират различни хибридни комбинации между бетулиновата киселина и други синтетични субстанции с цел повишаване на наблюдавания ефект и разработването на иновативни продукти за контрол на затлъстяване. Идеята на мултитаргетната терапия цели повлияване на повече от една ефекторна структура, за получаване на оптимален ефект. Получените данни за механизма на действие на включените в настоящия труд чисти вещества дават основание за бъдещо комбиниране на бетулинова и розмаринова киселина. На теория, комбинирането на тези две молекули покрива по-широк спектър от механизми, чрез които е възможно повлияване на затлъстяването, а именно – адипогенезата, адиполизата и нискостепенното възпаление.

## VII. ИЗВОДИ

1. Получени са данни за фитохимичния профил на екстракти от листа от *Z. jujuba*, надземни части от *P. aviculare* и *P. hydropiper* чрез метаболитно профилиране с ЯМР.
2. Успешно е структурирана платформа за *in vitro* скрининг на анти-адипогенния потенциал на растителни екстракти и природни молекули при човешки SGBS адипоцити.
3. Трите изследвани екстракта показват инхибиращо действие върху процесите на адипогенеза и липолиза, като най-изявена анти-адипогенна активност е отчетена за екстракта от *Z. jujuba*.
4. Бетулинова киселина, характерна за екстракт от хинап е с най-изразено анти-адипогенно действие и ефект върху ключови сигнални пътища като PI3K/AKT при *in vitro* модел на затлъстяване на човешки адипоцити.
5. Бетулинова киселина потиска липидния метаболизъм *in vivo* при моделен организъм *C. elegans* чрез модулиране на транскрипционния фактор *nhr-49*, регулиращ процесите на липиден синтез и хидролиза.
6. Бетулинова киселина регулира инсулин-медираната адипоцитна дифенциация посредством PI3K/AKT сигналния път, експресията на транскрипционния фактор *nhr-49*/PPARs и микроРНКи свързани с липидния метаболизъм.

## VIII. ПРИНОСИ

С научно-фундаментален характер:

1. Установена е анти-адипогенната активност на екстракти от листна маса от *Z. jujuba* и надземни части от *P. aviculare* и *P. hydropiper* в *in vitro* модел на затлъстяване при човешки адипоцити.
2. Определени са молекулярните пътища, участващи в механизма на анти-адипогенно действие на апигенин, бетулинова и маслинова киселина в адипоцити.
3. Охарактеризиран е ефекта на розмаринова киселина при SGBS адипоцити върху адипогенеза и липолиза, както и върху експресията на възпалителни фактори по време на адипоцитната диференциация.
4. Доказано е, че инхибиторният ефект върху липидните депа при приложение на бетулинова киселина (10  $\mu$ M) е свързан със стимулиране на експресията на *nhr-49* и *acs-2*, докато в концентрация от 50  $\mu$ M бетулиновата киселина повлиява гени, свързани с липидната хидролиза и действието на десатуразите при *C. elegans*.
5. Установен е ефектът на бетулинова киселина върху експресията на микроРНКи, чиито таргетни гени, участват в процесите на липолиза и липогенеза при *C. elegans*.

С научно-приложен характер:

1. Въведен и оптимизиран е *in vitro* модел на адипоцитна диференциация като скринингова платформа за анти-адипогенен потенциал на растителни екстракти и природни молекули.
2. Адаптиран е модел за изучаване на фенотипа и липидното натрупване при затлъстяване в нематоди от вида *C. elegans*, който представлява *in vivo* платформа за оценка на анти-обезогенния потенциал на молекули с различен произход.
3. Получените данни за молекулярния механизъм на действие на бетулиновата киселина, могат да послужат като основа за разработване на продукт(и) за контрол на телесното тегло и профилактика на затлъстяването.

## **Благодарности**

Бих искала да благодаря на моя научен ръководител - проф. д-р Милен И. Георгиев за помощта, подкрепата и ценните насоки по време на цялата докторантура, както и при изготвяне на настоящия дисертационен труд. Също така, съм признателна на проф. Георгиев за предоставените условия и възможност да творя наука в България.

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-C01, финансиран от Европейски Фонд за Регионално Развитие чрез оперативна програма „Наука и Образование за Интелигентен Растеж“.

Изказвам своята благодарност и на моите колеги от лаборатория по Метаболомика към Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ при БАН, гр. Пловдив и Център по Растителна и Системна Биология и Биотехнология, гр. Пловдив за приноса в процеса на изготвяне на този дисертационен труд, както и за взаимните уроци, идеите, работата в екип и доверието, които допринесоха и за усъвършенстването ми като изследовател и човек.

Изразявам своята искрена признателност на проф. д-р Мартин Вабич и д-р Даниел Тулс от Университета в Улм, Германия за съвместната работа, ценните методологически насоки и безвъзмездното предоставяне на клетъчната линия човешки адипоцити SGBS. Благодарна съм и на проф. д-р Густино Орландо и доц. д-р Клаудио Феранте от Университета в Киети, Италия за съвместната работа по компютърния докинг анализ, както и на доц. д-р Ина Анева от Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН за ботаническото определяне на предоставените хербарийни екземпляри от изследваните растителни видове.

Благодаря на ръководството на Института по микробиология “Стефан Ангелов” за институционалната подкрепа.

И последно, но не по важност, изказвам огромна благодарност на семейството и приятелите си, за това че насърчават моето развитие, както и за проявеното търпение през годините.

## Публикувани материали по дисертацията

### Научни публикации

1. **Savova M.S.**, Todorova M.N., Apostolov A.G., Yahubyan G.T., Georgiev M.I., Betulinic acid counteracts the lipid accumulation in *Caenorhabditis elegans* by modulation of *nhr-49* expression, *Biomed. Pharmacother.* 156 (2022) 113862 (**IF<sub>2021</sub> 7.419; Q1**).
2. **Savova M.S.**, Apostolov A.G., Mihaylova L.V., Georgiev M.I., Modulation of adipogenesis by *Polygonum hydropiper* L. and *P. aviculare* L. extracts, *Macedonian Pharm. Bull.* 68 (2022) 155–156.
3. Georgiev M.I., Vasileva L.V., **Savova M.S.**, Antiobesity molecules of natural origin, *Food Front.* 2 (2022) 23–24.
4. **Savova M.S.**, Vasileva L.V., Mladenova S.G., Amirova K.A., Ferrante C., Orlando G., Wabitsch M., Georgiev M.I., *Ziziphus jujuba* Mill. leaf extract restrains adipogenesis by targeting PI3K/AKT signaling pathway, *Biomed. Pharmacother.* 141 (2021) 111934 (**IF<sub>2021</sub> 7.419; Q1**).
5. Vasileva L.V., **Savova M.S.**, Tews D., Wabitsch M., Georgiev M.I., Rosmarinic acid attenuates obesity and obesity-related inflammation in human adipocytes, *Food Chem. Toxicol.* 149 (2021) 112002 (**IF<sub>2021</sub> 5.572; Q1**).
6. Vasileva L.V., **Savova M.S.**, Amirova K.M., Dinkova-Kostova A.T., Georgiev M.I., Obesity and NRF2-mediated cytoprotection: Where is the missing link? *Pharmacol. Res.* 156 (2020) 104760 (**IF<sub>2020</sub> 7.658; Q1**).

Общ импакт фактор – 28

### Участия на научни форуми

#### Устни доклади

1. **Savova M.S.**, Mihaylova L.V., Mladenova S.G., Georgiev M.I., Betulinic acid affects lipid accumulation during differentiation of human adipocytes. *International Scientific Conference on Plant Biodiversity and Sustainability*, 13-14 October 2022, Online conference.
2. Georgiev M.I., Vasileva L.V., **Savova M.S.**, Anti-obesity molecules of natural origin. *4<sup>th</sup> International Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food*, 30 November - 04 December 2020, Xi'an, China.

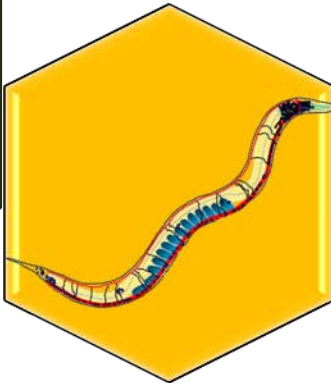
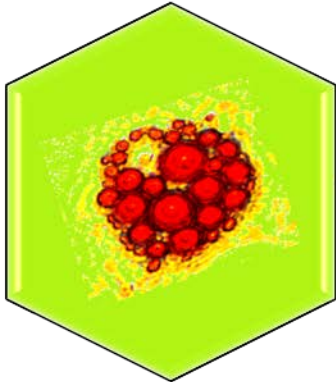
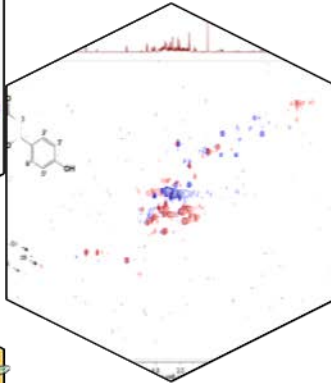
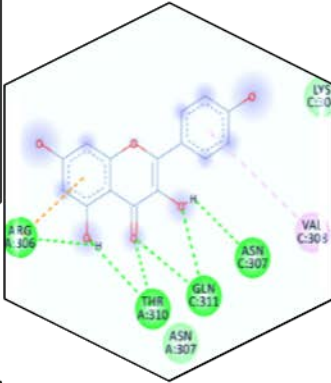
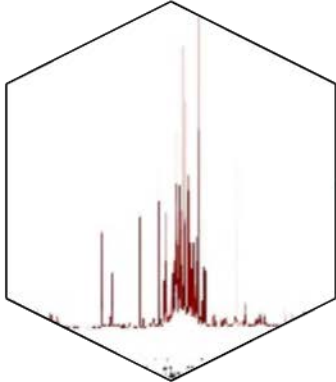
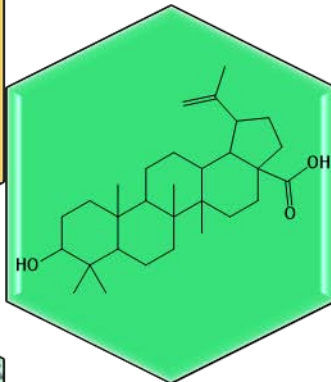
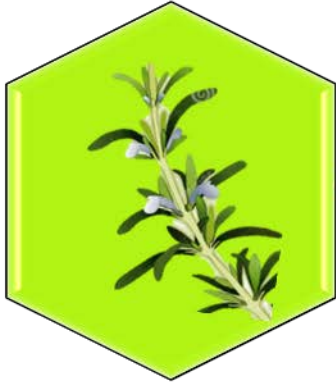
### Постерни презентации

3. **Savova M.S.**, Apostolov A.G., Mihaylova L.V., Georgiev M.I., Modulation of adipogenesis by *Polygonum hydropiper* L. and *P. aviculare* extracts. *11<sup>th</sup> Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries*, 6-10 October 2022, Ohrid, Republic of North Macedonia.
4. **Savova M.S.**, Todorova M.N., Apostolov A.G., Yahubyan G.T., Georgiev M.I., Betulinic acid decreased glucose-induced lipid accumulation in *Caenorhabditis elegans* via modulation of *nhr-49* expression. *Natural Products in Drug Discovery and Development – Advances and Perspectives*, 19-22 September 2022, Iasi, Romania.
5. **Savova M.S.**, Vasileva L.V., Mladenova S.G., Amirova K.M., Blacheva-Sivenova Z.P., Georgiev M.I., Betulinic acid affects lipid accumulation during differentiation of human SGBS adipocytes. *1<sup>st</sup> International Conference on Plant Systems Biology and Biotechnology*, 14-17 June 2021, Golden Sands Black Sea resort, Bulgaria.
6. **Savova M.S.**, Balcheva-Sivenova Z.P., Mladenova S.G., Amirova K.M., Vasileva L.V., Georgiev M.I., Extract of *Ziziphus jujube* Mill. leaves reduces lipid accumulation in adipocytes. *1<sup>st</sup> International Conference on Plant Systems Biology and Biotechnology*, 14-17 June 2021, Golden Sands Black Sea resort, Bulgaria.

### Получени награди

Награда „Иван Евстратиев Гешов“ за най-млади учени в направление „Биомедицина и качество на живот“ за 2021 г.

**Цитирания на публикациите**, свързани с дисертационния труд с изключени самоцитирания – 79 (справка в Скопус, 06.06.2023); индекс Хирш – 7.



**PPARs/nhr-49**  
**CEBPs/cebp-2**  
**ACC/pod-2**