

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



Кристиана Мирославова Амирова

**Изолиране на природни молекули от растителен произход, модулиращи
функцията на транскрипционен фактор Nrf2**

АВТОРЕФЕРАТ

на

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

Професионално направление 5.11 „Биотехнологии“
Научна специалност „Технология на биологично активните вещества“

Научни ръководители:
доц. д-р Петя А. Димитрова
проф. д-р Милен И. Георгиев

София, 2023

Автореферата съдържа 52 страници и е илюстриран с 13 фигури и 1 таблица. Библиографската справка включва 84 литературни източника.

В автореферата е използвано номериране на фигурите и таблиците, което не съответства на номерирането в дисертационния труд.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на Националния семинар по „Приложна микробиология и микробни биотехнологии” проведено на 28.06.2023 г. в Институт по микробиология "Стефан Ангелов", БАН, ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 26, 1113 София.

Изследванията, включени в дисертацията, са проведени в Лаборатория по метаболомика към Департамент по биотехнология и Лаборатория по експериментална имунотерапия към Департамент по имунология, Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН, в Институт по органична химия с Център по фитохимия и в Център по растителна системна биология и биотехнология, Пловдив.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на от в заседателната зала на Института по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“ бл. 26 на открито заседание на Научно жури.

Материалите по защитата са на разположение в Деловодството на Институт по микробиология „Стефан Ангелов”, ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 26, 1113 София, както и са публикувани съгласно Закона за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) на www.microbio.bas.bg.



Кристиана Мирославова Амирова

**Изолиране на природни молекули от растителен произход, модулиращи
функцията на транскрипционен фактор Nrf2**

АВТОРЕФЕРАТ

на

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР“
в професионално направление: 5.11 „Биотехнологии“,
научна специалност „Технология на биологично активните вещества“

Научни ръководители:

доц. д-р Петя А. Димитрова

проф. д-р Милен И. Георгиев

Научно жури:

Вътрешни рецензенти:

Доц. д-р Николина Михайлова Михайлова

Доц. д-р Златка Милчева Алексиева

Проф. д-р Милен Иванов Георгиев

Външни рецензенти:

Проф. д-р Велизар Костадинов Гочев

Проф. д-р Милена Петкова Попова

София, 2023

Съдържание

Използвани съкращения	5
I. Въведение	7
II. Цел и задачи	10
III. Материали и методи	11
IV. Резултати	12
V. Дискусия	32
V.1. Растителни екстракти и техни метаболити – източник на потенциални нискомолекулни съединения	32
V.2. Модифициране на Nrf2 в неутрофили – терапевтичен потенциал	37
VI. Изводи	42
VII. Приноси	43
VIII. Публикации и научна активност, свързани с дисертационния труд	44
IX. Благодарности	46
X. Библиография	47

Използвани съкращения

Съкращение	Наименование на български и/или английски език
БАВ	Биологично-активни вещества
СЗО	Световна здравна организация
ЯМР	Ядрено-магнитен резонанс
β -TrCP	β -transducin repeat-containing protein
ADAMTS	Disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
Akt	Protein kinase B, serine/threonine kinase
АМПК	AMP-activated protein kinase
AP-1	Activator protein 1
APC	Allophycocyanin
ARE	Antioxidant responsive element
Аmt	AhR nuclear translocator
Bach 1	Transcription factor BTB and CNC homology 1
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BTB	Bric-à-Brac domain (BTB) of Keap1
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CBP	CREB-binding protein
CC	Колонна хроматография
CE-MS	Капилярна електрофореза с маспектрометрия
CHD	Chromodomain helicase DNA binding protein
ChIP-Seq	Chromatin immunoprecipitation followed by sequencing
CNC	Cap'n'collar
COSY	Н-Н корелационна спектроскопия
COX	Cyclooxygenase
Cul3	Cullin 3
DGR	Diversity-generating retroelements
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GCLC	Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit
GC-MS	Газова хроматография с маспектрометрия
GSH	Glutathione
GSK-3	Glycogen synthase kinase-3
H&E	Haematoxylin and eosin
HDAC	Histon deacetylase
HMBC	Хетеронуклеарният множествен корелационен анализ
HO-1	Heme oxygenase 1
Hrd1	HMG-CoA reductase degradation protein 1
HRP	Horseradish peroxidase
HSQC	Хетеронуклеарният единичен квантов кохерентен анализ
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	Inducible nitric oxide synthase

IVR	Intervening region domain in Keap1
Keap1	Kelch like ECH associated protein 1
LC-MS	Течна хроматография с масспектрометрия
LPS	Lipopolysaccharide
Mac-1	Macrophage 1 antigen
Maf	Musculoaponeurotic fibrosarcoma protein
MDA	Malondialdehyde
microPHK	Къса едноверижна некодираща РНК
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MMP	Matrix metalloproteinases
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.
NF-ATc1	Nuclear factor of activated T cells 1
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NLRP3	NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3
Notch	Neurogenic locus notch homolog protein
Nox4	NADPH Oxidase 4
NQO1	NAD (P)H quinone dehydrogenase 1
Nrf2	Nuclear factor E2-related factor 2
OA	Остеоартрит
PE	Phycoerythrin
PE-Cy	Phycoerythrin-cyanin
PGE	Prostaglandin E
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKC	Protein kinase C
PRX1	Peroxiredoxin 1
PTLC	Препаративна тънкослойна хроматография
RA	Ревматоиден артрит
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa beta (NF- κ B ligand)
ROS	Reactive oxygen species
RT-qPCR	Полимеразната верижна реакция в реално време
siPHK	Малка интерферираща РНК
SOD	Superoxide dismutase
SNP	Single nucleotide polymorphisms
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TRX	Thioredoxin

I. Въведение

Растенията са ценен източник на биологично-активни вещества. Различни видове тревисти растения и дървесни видове, са охарактеризирани чрез емпиричните подходи на традиционната народна медицина като „билки“. Съвременното знание за традиционното приложение на медицинските растения е обект на изучаване на етноботаниката и етнофармакологията. Поради изключителния тласък на научните изследвания в посока към търсене на нови терапевтични подходи, през последните няколко десетилетия растенията, източник на биологично-активни вещества с приложение в медицината, са обект на нарастващ интерес.

Голяма част от днешните терапевтични средства и хранителни добавки са от растителен произход или включват биологично-активни вещества (БАВ), които първоначално са били изолирани от растения, а след това са синтезирани химически с цел опазване на екологичното разнообразие на растителните видове. Според Световната здравна организация (СЗО), 80% от хората по света поддържат здравословното си състояние със средства от растителен произход и около 21 000 растителни вида имат потенциал да бъдат използвани като лечебни растения. В последните 10 години се полагат големи усилия за идентифициране и охарактеризиране на природни продукти с противовъзпалителна, антибактериална, противоогъбична и противотуморна активност. В последователния алгоритъм за откриване на нови терапевтични средства се прилагат разнообразни мултидисциплинарни подходи, като *in silico* анализ и математическо моделиране, фитохимичен анализ и изолиране на БАВ, органичен синтез на прекурсори на биологично-активни вещества, биотехнологично манипулиране на растителния геном, разнообразни *in vitro* и *in vivo* експериментални модели на заболявания за изследване на терапевтичния потенциал и за установяване на тяхната бионаличност, както и за проследяване на страничните ефекти от приложението им (Atanasov et al., 2021; Lui et al., 2023; Pan et al., 2014).

Въпреки напредъка в терапията на хроничните заболявания, комплексната им патология налага търсенето на иновативни подходи за лечение, основани на таргетиране на ключови сигнални пътища и/или молекули, регулатори, разнообразни метаболитни процеси и ефекторни механизми и/или на клетки, с ключова роля в патогенезата на заболяванията. В настоящата дисертация се цели да се идентифицират вещества от растителен произход, които да модулират *in vitro* и *in vivo* функцията и експресията на транскрипционния фактор nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2). Този протеин има ключовата роля в регулацията на метаболизма, диференциацията и функцията на имунни и костни клетки, участващи в патогенезата на хронични възпалителни и дегенеративни ставни заболявания. Таргетирането на Nrf2 чрез природни молекули би предложило нов подход за терапия и мониторинг на тези хронични заболявания и съпътстващите ги патологии.

В настоящия дисертационен труд е използван следният алгоритъм на изследване. Чрез етнофармакологичния подход са селектирани следните растения - *Ballota nigra* L. (капела), *Clinopodium vulgare* L. (котешка стъпка), *Leonurus cardiaca* L.p (дяволска уста) и *Haberlea rhodopensis* Friv (родопски силивряк), които се използват в традиционната медицина като противовъзпалителни средства (Benina et al., 2013; Kofidis and Bosabalidis, 2012; Micota et al., 2016; Morteza-Semnani and Ghanbarimasir, 2019). След задълбочено системно изследване на литературните данни, е получена предварителна информация за съдържание на конкретни БАВ, които допринасят за противовъзпалителното действие на екстрактите. Паралелно, е събран растителен материал от диворастящи *B. nigra* L., *C. vulgare* L., *L. cardiaca* L.p и *H. rhodopensis* Friv. Поради интерес към ендемичен вид в изследването и с цел запазване на биологичното разнообразие, е въведен метод за *in vitro* култивиране на *H. rhodopensis* Friv. Следваща стъпка включва приготвяне на метанолни екстракти от растенията и определяне на метаболитния им профил посредством ядрено-магнитен резонанс (ЯМР). Методът на ЯМР-базирано метаболитно профилиране позволява

да се идентифицира моментен „отпечатък“ на съдържащите се първични и вторични метаболити (Salem et al., 2020). След фракциониране и изолиране на чисти вещества от екстрактите е извършено количествено определяне на съдържанието им чрез високо ефективна течна хроматография (ВЕХТ). Друг ключов елемент в нашите изследвания е определянето на подходяща клетъчна популация за оценка на действието на екстракта, фракциите или чистите вещества върху функцията на Nrf2 *in vitro* и *in vivo*. Тъй като нашата цел бе да открием модулатори на функцията на Nrf2, се фокусирахме върху таргетна популация от неутрофили, за която оптимизирахме методите за идентифициране на експресията на Nrf2 на транскрипционно и транслационно ниво.

Транскрипционният фактор Nrf2 е еволюционно консервативен и се експресира при безгръбначни като нематоди (*Caenorhabditis elegans*), насекоми (*Drosophila*), риби, птици и бозайници, включително при човека, но не се открива в растения и гъби. За разлика от други членове на семейството на Nrf транскрипционните фактори, той не е абсолютно необходим за поддържане на клетъчната виталност, липсата му не е летална за ембриона и не е свързан за ендоплазматичния ретикулум, а се локализира в цитозола. В цитозола той е негативно регулиран от репресорен протеин - Kelch like ECH associated protein 1 (Keap1). Протеинът Nrf2 се кодира от *NFE2L2* гена в човешкият геном. Локусът на този ген е в дългото рамо на втора хромозома 2q31.2. При хомеостатични условия, Nrf2 е постоянно насочен за протеазомно разграждане от комплекса убиквитин лигаза, формиран при взаимодействие на Keap1 с Cul3 E3. Бързото деградиране на Nrf2, обаче изисква бързо попълване на пула с новотранслиран протеин, и непрекъсната регулация на *NFE2L2* експресията и транслацията до протеин. При повишени нива на клетъчен стрес взаимодействието на Nrf2 с Keap1 се нарушава, което инхибира убиквитивирането и протеазомното разграждане на Nrf2. В резултат Nrf2 се активира, стабилизира и преминава в ядрото, където се свързва с таргетни последователности и други регулаторни транскрипционни фактори от семейството на Maf протеините. Установено е, че най-честите таргетни последователности за свързване с Nrf2 са характерни за промотори на гени от антиоксидантната защита, наречени anti-oxidant response elements (ARE) елементи, като димерът Nrf2-sMaf се локализира в близост до ДНК последователност 5'-TGACTCAGC-3'. Установено е че Nrf2 регулира експресия на голямо многообразие на таргетни гени и това се дължи на факта, че той участва допълнително в ремоделни комплекси и може да се свързва и с последователности, които не са част от ARE мотивите, като предизвиква трансактивация на гени, които не са задължително част от антиоксидантния отговор, а участват във възпаление, апоптоза и пролиферация. Това показва, че нивото на експресия на Nrf2, индуцирано от стресови сигнали, може не само да задейства директно експресия на гени, но и да предизвика трансактивация на таргетни гени, които чрез обратна връзка да модулират нивото на Nrf2 в цитозола (Badenetti et al., 2023; Jung et al., 2018).

Таргетните гени повлиявани от Nrf2 са обособени в две отделни групи. Първият набор от идентични гени е охарактеризиран в различни тъкани, еволюционно консервативен е и включва гените от антиоксидантната защита и метаболизма на ксенобиотици като *NQO1*, *GCLC*, *GCLM*, и *TXNRD1*. Втората група от Nrf2 таргетни гени включва специфични за дадения клетъчен тип и зависими от стимула, последващо формиране на ремоделни комплекси и трансактивацията на други гени. Голямото разнообразие от гени, таргетирани от Nrf2 предполага, че ефектите от фармакологично повлияване на Nrf2 са многообразни и вероятно с добър потенциал при патологии със сложен механизъм и ангажиране на разнообразни клетъчни типове (Baird and Dinkova-Kostova, 2011; Kobayashi et al., 2004).

Съществуват различни стратегии за повлияване на активността на Nrf2: чрез приложение на електрофилни молекули; чрез инхибитори на комплекса Keap1/Nrf2; чрез таргетиране на сигнални пътища, свързани с активиране, стабилизиране или транслокация на Nrf2 от цитоплазмата в ядрото. Досега известните активатори на Nrf2 нямат селективност към определен клетъчен тип, като действат върху всички клетки, които са изложени на

оксидативен или метаболитен стрес. Понастоящем най-силните активатори на Nrf2 са електрофили (сулфорафан), които обаче имат ниска бионаличност и селективност, затова се търсят нови активатори на Nrf2, с по-селективно действие и с по-добър фармакокинетичен профил (Pan et al., 2016; Wakabayashi et al., 2004).

Едни от най-изучаваните ефекти на Nrf2 активаторите се тези при дегенеративни заболявания, където оксидативният стрес и подлежащото хронично възпаление са основни фактори, поддържащи прогресията на заболяванията. Хроничното възпаление, индуцирано от автоимунни реакции – например при ревматоиден артрит, може да предизвика промени, които да добавят механичен и оксидативен стрес в ставната структура. На клетъчно ниво оксидативният стрес причинява увреждане на митохондриална и ядрена ДНК, липидна пероксидация, промени в клетъчното сигнализиране, транскрипция и епигенетични промени в генната експресия. Хроничното възпаление поддържа деструкцията чрез цитокини като тумор некротизиращ фактор- α (TNF- α), интерлевкин (IL)-1 β , 8, 6, 15, 17, 18, 21, 33, и хемокини, простагландини и растежни фактори, като трансформиращ растежен фактор- β (TGF- β), фибробластен растежен фактор, матриксни металопроотеинази (MMPs). През последните години са получени данни за ролята на Nrf2 при ставни възпалителни и дегенеративни заболявания, както и са предложени терапевтични подходи за повлияване на Nrf2 при тези заболявания (Jazayeri et al, 2015; Khan et al., 2017; Liu et al., 2018). Въпреки, че ефектът от фармакологично приложение на Nrf2 активатори при костни клетки е изследван, все още не е демонстриран потенциала на Nrf2 върху функцията на неутрофили, които са с особено важна роля при ставни дегенеративни и възпалителни заболявания

В обобщение, нашият експериментален план включва приложение на Nrf2 активатор при модели на ставно дегенеративно заболяване и установяване на ефекта от приложение на конкретен екстракт и чисти вещества при модел на ставно хронично възпаление. Демонстрирането на терапевтичния потенциал от фармакологично модулиране на функцията на Nrf2 при ставни възпалителни и дегенеративни заболявания би имал значение за прилагане на алтернативна терапия, например при пациенти, които не отговарят на биологична терапия или имат нужда от по-продължителни периоди на ремисия с цел възстановяване на ставната структура и функционалност.

II. Цели и задачи

II.1. Цел

Целта на настоящия дисертационен труд е да се идентифицират и охарактеризират нискомолекулни съединения от растителни екстракти от *B. nigra*, *C. vulgare*, *L. cardiaca* и *H. rhodopensis* с потенциал за въздействие върху транскрипционния фактор Nrf2 в таргетна популация от неутрофили и да се демонстрира терапевтичното им действие върху функцията на неутрофили при модели на ставни възпалителни и дегенеративни заболявания.

II.2. Задачи

II.2.1. Подбор на растителен материал и подготовка на растителни екстракти.

II.2.2. Систематичен преглед на етнофармакологичните данни за противовъзпалителен ефект и потенциал за таргетиране на Nrf2 чрез нискомолекулни природни съединения.

II.2.3. Определяне на фитохимичния състав на избраните растителни екстракти чрез метаболитно профилиране посредством ЯМР.

II.2.4. Изследване на противовъзпалителният ефект на избрани екстракти върху неутрофили.

II.2.5. Провеждане на оптимизация на анализа за експресия на Nrf2 на протеиново и транскрипционно ниво в човешки гранулоцити и миши неутрофили.

II.2.6. Доказване на хипотезата, че локалното приложение на Nrf2 активатор върху функцията на неутрофили има терапевтичен ефект при модел на дегенеративно ставно заболяване.

II.2.7. Провеждане на *in vitro* и *in vivo* анализи за изучаване на ефекта на растителни екстракти, фракции и чисти вещества от избран растителен вид, върху експресията на Nrf2 на протеиново и транскрипционно ниво в миши неутрофили и диференцирани човешки гранулоцити.

II.2.8. Определяне на биологичната значимост на фармакологично модулиране на Nrf2 с фракция и чисти вещества от избран растителен екстракт *in vitro* и *in vivo* в модел на ставно хронично възпаление.

III. Материали и методи

III.1. Химикали и реагенти

Използваните химикали и реагенти, включително и чисти вещества са закупени от Sigma-Aldrich, Fluka, Merck, Millipore, Calbiochem, Roche (Munich or Darmstadt, Germany) или Thermo Scientific Acros Organics (London, UK).

III.1.1. Антитела и китове

Използвани са китове за определяне на апоптоза, продукцията на цитокини, изолиране на CD11b клетки, и антитела, конюгирани с флуорохроми за проточна цитометрия, специфични първични и вторични антитела за имуноблот и вътреклетъчна флуоцитометрия. Те са закупени от фирмите Abcam, (Cambridge, UK); Biolegend (London, UK); BD Biosciences и BD Pharmingen (San Jose, CA, USA); R&D Systems (Abingdon, UK); Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

III.1.2. Най-често използвани разтвори и среди

Използвани са следните разтвори: PBS буфер, D-PBS буфер съдържащ Ca^{2+} и Mg^{2+} , TES буфер за колагеназа, лизиращ буфер за еритроцити, FACS буфер за флуоцитометрия, буфер за екстракция на синовиални екстракти, йонен разтвор, фиксиращ буфер, PBS-TRIS буфер за имуноблот, RIPA буфер за приготвяне на клетъчни лизати за имуноблот, хромогенен субстрат за β -галактозидазна активност.

За култивиране на клетки са използвани следните среди и свързани химикали: RPMI 1640 среда с L-глутамин и натриев бикарбонат, разтвор на антибиотици 100x, разтвор на аминокиселини 50x, фетален телешки серум, инактивиран термично.

III.1.3. Клетъчна линия

Използвана е миелобластна човешка клетъчна линия HL-60 с ATCC №CCL-240, пасаж 2.

III.1.4. Лабораторни животни

Мишки от линия Balb/c са закупени от Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA). Мишки от линията ICR са закупени от Развъдна база на БАН (Сливница, България). Всички експерименти са проведени под анестезия и под контрола на сертифициран ветеринарен лекар. Те са одобрени от Националната агенция по храните (София, България) с лиценз за експериментални процедури № 105/10.07.2014 г.

III.2. Методи

III.2.1. Системен анализ на литературата

III.2.2. Екстракция, фракциониране и изолиране на чисти вещества

III.2.3. Фитохимичен анализ

III.2.4. Изолиране, култивиране и диференциация на клетки

III.2.5. Третиране на диференцирани гранулоцити или миши неутрофили с нискомолекулни съединения

III.2.6. Определяне на клетъчна жизненост, апоптоза и некроза

III.2.7. Флуоцитометричен анализ

III.2.8. *In vitro* хемотаксис към SDF-1

III.2.9. Имуноблот за определяне на Nrf2

III.2.10. Имунофлуоресценция

III.2.11. Определяне на β -галактозидазна активност

III.2.12. Полимеразна верижна реакция в реално време (RT-qPCR) на иРНК

III.2.13. *In vivo* модели на ставно възпаление или индуциране на нестабилност в ставата

III.3. Статистически анализ с параметричен Student t-тест или ANOVA с post hoc тест на Bonferroni и Pearson корелационен анализ се извърши със софтуер SigmaPlot v11.0, InStat3.0 и GraphPad Prism 5.0, като за значима се определи разлика по-ниска от 0.05 ($p < 0.05$).

IV. Резултати

IV. 1. Метаболомен анализ на екстракти и чисти вещества.

Системният литературен анализ показва, че има сравнително малък брой изследвания, при които е описан ефекта на растителните екстракти от *H. rhodopensis*, *B. nigra*, *C. vulgare* и *L. cardiaca* или конкретни чисти молекули от техни екстракти, върху активността и експресията на транскрипционния фактор Nrf2, както и данни за подобен ефект върху функцията на неутрофили. Това обосновава нашата насока към по-слабо изследван имуноген клетъчен тип, с цел проследяване на ефекта на екстракти и чисти молекули от растения върху експресията на Nrf2.

Метанолни екстракти от *H. rhodopensis*, *B. nigra*, *C. vulgare* и *L. cardiaca*, събрани от естествени местообитания в България, бяха подложени на фитохимичен анализ чрез ЯМР-метаболитно профилиране и ВЕТХ (Таблица 1).

Данните от ЯМР анализа удостоверяват наличие на биологично-активни вещества (Таблица 1), а именно: в екстракт от *C. vulgare* - розмаринова, кафеена и хлорогенова киселини и катехин; в екстракт от *B. nigra* - балонигрин и вербаскозид, в растителен екстракт от *L. cardiaca* - леонуриин и стахидрин, в екстракт от *H. rhodopensis* - миконозид и калцеолариозид Е. При допълнителна литературна справка, бе установено че част от тези БАВ се свързват с термина „Nrf2“, което предположи потенциал за модулиране на експресията и активността на транскрипционния фактор.

Особен интерес представляваше растителният екстракт от *H. rhodopensis*, където не само бяха идентифицирани два метаболита, миконозид и калцеолариозид Е, но и бяха получени фракции с различно съотношение на тези две чисти съединения с цел определяне на биологичната им активност. Получените фракции бяха наименовани от А-Ј, всяка от които бе охарактеризирана чрез ВЕХТ анализ за съдържание на миконозид и калцеериозид Е. В допълнение бе адаптиран протокол за *in vitro* култивиране на *H. rhodopensis*, който повишава съдържанието на миконозид и калцеолариозид Е в екстракта до 12 пъти и 30 пъти, съответно, спрямо диворастящия вид.

IV. 2. Избор на таргетни клетки за изследване на действието на растителните екстракти – неутрофили

В наши пилотни изследвания бе определена подходяща таргетна популация за изследване на биологичния ефект на растителните екстракти. Неутрофилите са елементи на вродения имунитет, които активно участват в патогенезата на ставни възпалителни и дегенеративни заболявания и състояния на остро възпаление, а повечето растителни екстракти, според литературната справка демонстрираха противовъзпалителен ефект. Екстракт от *C. vulgare* бе използван за тези пилотни експерименти поради факта, че метаболомният анализ показва наличие на активни вторични метаболити като катехин, кафеена и хлорогенова киселина. Тези чисти природни молекули имаха с противовъзпалително действие, което бе постигнато чрез модифициране на активността на циклооксигеназа-2 (COX-2), и вероятно, чрез потискане на сигналните пътища през nuclear factor kappa B (NF-κB) и p38 MAPK (Kulabas et al., 2018).

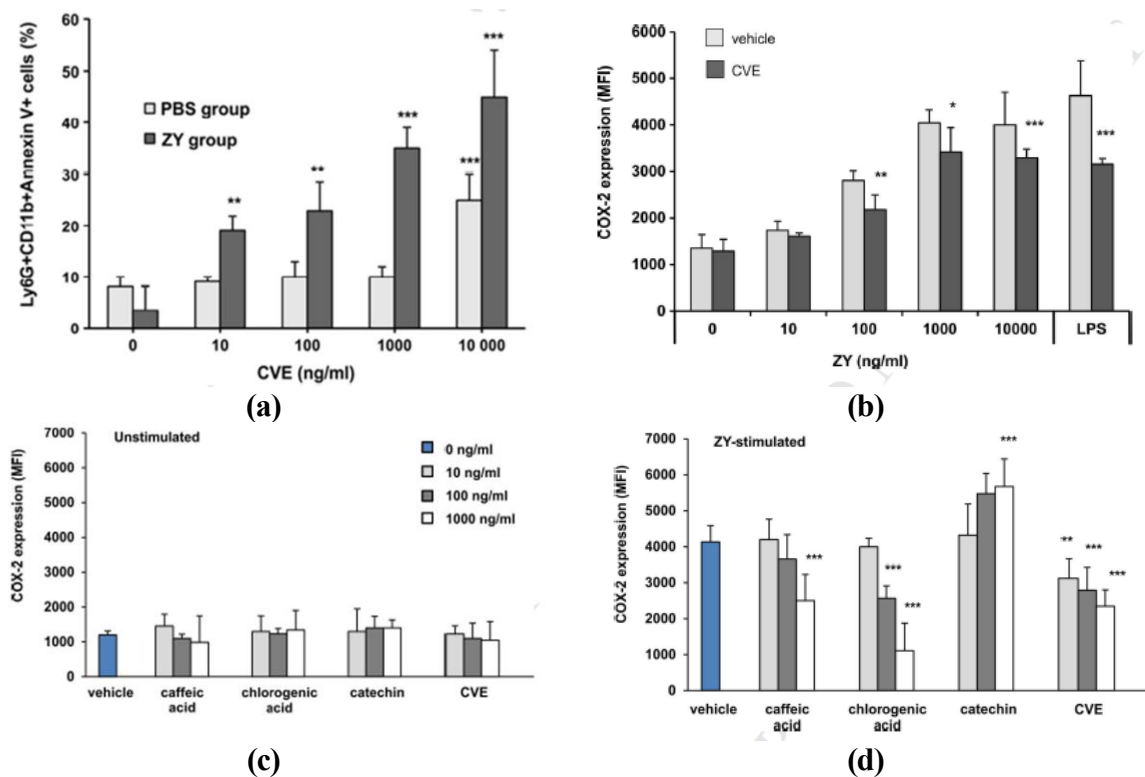
В нашите опити бяха включени два типа неутрофили – клетки, изолирани от костен мозък на здрави мишки и такива, изолирани от мишки, инжектирани със зимозан. Неутрофилите от мишки със зимозан-индуцирано възпаление, бяха пре-активирани и показаха по-висока експресия на CD11b (интензитет на флуоресценция (MFI)=18134 при клетки от ZY мишки спрямо MFI=9567 при клетки от здрави животни). И двете популации след изолиране имаха сходно ниво на апоптоза, определено след маркиране с Annexin V (Annexin+ Ly6G+ неутрофили бе $5.5 \pm 1.5\%$ (n=8) спрямо $5.8 \pm 1.2\%$ (n=8)).

Таблица 1. Изследвани метаболити в растителните екстракти чрез ЯМР

Метаболити	Константа на химично отместване (ppm)	Константа на сдвояване (Hz)	<i>H. rhodopenensis</i>	<i>B. nigra</i>	<i>C. vulgare</i>	<i>L. cardiaca</i>
Аминокиселини						
Аланин	1.49	(d, $J = 7.21$)	+	+	+	+
Глутамин	2.14/2.46	(m)/(m)	+	+	+	+
Глутамат	2.07/2.36	(m)/(m)0	-	-	+	+
Треонин	1.34	(d, $J = 6.8$)	+	+	-	+
Левцин	0.99/0.97	(d, $J = 6.3$)/(d, $J = 6.3$)	-	+	-	+
Валин	1.01/1.06	(d, $J = 7.1$)/(d, $J = 7.1$)	+	+	+	+
Глицин	3.54	s	+	+	-	+
Въглехидрати						
α -Глюкоза	5.18	(d, $J = 3.8$)	+	+	+	+
β -Глюкоза	4.59	(d, $J = 7.9$)	+	+	+	+
Сукроза	5.41/4.17	(d, $J = 3.8$)/(d, $J = 8.7$)	+	+	+	+
Органични киселини						
Мравчена киселина	8.47	(s)	-	+	+	-
Оцетна киселина	1.92	(s)	+	+	+	+
Янтарна киселина	2.47	(s)	-	+	-	-
Фумарова киселина	6.53	(s)	-	+	+	-
Ябълчена киселина	2.81/2.95/3.94	(dd, $J = 17.0$; 8.3)/(dd, $J = 17.0$; 3.8)/(dd, $J = 8.3$; 3.8)	+	-	+	-
Лимонена киселина	2.56/2.74	(d, $J = 11.96$)/(d, $J = 4.3$)	+	-	+	-
Аскорбинова киселина	4.52	(d, $J = 2.0$)	-	-	-	-
Галова киселина	7.04	s	+	+	-	-
Флавоноиди						
Апигенин	6.68/6.33/6.54/7.89/7.02	(s)/(d, $J = 3.3$)/(d, $J = 2.2$)/(d, $J = 8.9$)/(d, $J = 8.3$)	-	-	+	-
Каемферол	6.33/6.54/7.98/7.02	(d, $J = 3.3$)/(d, $J = 2.2$)/(d, $J = 8.9$)/(d, $J = 8.3$)	-	-	+	-

Катехин	4.66/4.11/2.81/2.54/5.99/6.01/ 6.91/6.87/6.71	(d, J = 7.8)/(td, J = 7.5; 5.5)/(dd, J = 16.5; 5.5)/(dd, J = 16.5; 7.5)/(d, J = 2.0)/(d, J = 2.0)/(d, J = 2.0)/(d, J = 8.3)/(dd, J = 8.1; 2.0)	-	-	+	-
Фенилпропаноиди						
Хлорогенова киселина	7.12/6.88/7.02/7.61/6.36/5.33	(d, J = 2.0)/(d, J = 8.2)/(dd, J = 8.2; 2.0)/(d, J = 16.0)/(d, J = 16.0)/(m)	-	+	+	+
Кафеене киселина	7.11/6.87/7.02/7.51/6.30	(d, J = 2.1)/(d, J = 8.3)/(dd, J = 8.3, 2.1)/(d, J = 16.0)/(d, J = 16.0)	-	-	+	-
Розмаринова киселина	7.11/6.87/7.02/6.83/6.77/6.71	(d, J = 2.0)/(d, J = 8.3)/(dd, J = 8.3, 2.1)/(d, J = 2.0)/(d, J = 8.1)/(dd, J = 8.3, 2.0)	-	-	+	-
Други						
Аденин	8.22/8.20	(s)/(s)	-	+	-	-
Холин	3.22	(s)	-	+	-	+
γ-аминобитурагова	1.92/2.31/3.01	(m)/(t, J = 7.5)/(t, J = 7.4)	+	-	+	+
Инозин	8.22/8.38	(s)/(s)	-	+	-	-
Инозитол	3.94/3.61/3.23	(m)/(m)/(m)	-	-	+	-

След култивиране за 18 часа, апоптозата на неутрофилите нарастна 1.1 пъти в групата на *in vivo* пре-активирани неутрофили и 2 пъти в групата на контролните клетки, което показва, че пре-активираните неутрофили бяха по-резистентни към апоптоза. При третиране на клетките с 100 и 1000 ng/mL от растителния екстракт от *C. vulgare* (CVE), апоптозата на клетките от здрави мишки не беше променена, докато пре-активираните неутрофили, показаха повишена апоптоза, което предполагаше специфична про- или анти-апоптична активност на метаболити в екстракта (Фигура 1a). Експресията на циклооксигеназа 2 беше индуцирана по дозозависим начин при здрави неутрофили чрез *in vitro* стимулиране за 6 часа със зимозан (10-10000 ng/mL) и подобно на стимулиране с LPS (Фигура 1b). При проследяване на ефекта на CVE и отделните метаболити, (катехини, кафеева и хлорогенова киселина) в концентрации 10, 100, 1000 ng/mL върху експресията на COX-2 при пре-активирани неутрофили, беше забелязано, че CVE потискаше експресията на циклооксигеназата, което вероятно се дължеше на действието на кафеена и хлорогенова киселина, но не и на наличието в екстракта на катехин (Фигура 1 c-d).



Фигура 1. Ефект на екстракт от *C. vulgare* (CVE) върху функцията на миши костно-мозъчни неутрофили. **(a)** Ефект на CVE върху апоптозата на неутрофили, изолирани от костен мозък на здрави мишки (PBS group) и мишки със зимозан-индуцирано остро възпаление (ZY група) и анализирана с проточна цитометрия след маркиране с FITC конюгиран Annexin V. Данните представят средно-аритметична стойност \pm SD от 2 експеримента с 4 мишки/група. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ спрямо контролната група, инкубирана с 0.3% DMSO (означена като 0), Student t-test. **(b)**. Ефект на CVE върху експресията на COX-2 неутрофили от здрави мишки, стимулирани *in vitro* със зимозан (ZY). Данните представят средно-аритметична стойност \pm SD на интензитета на флуоресценция (MFI) при 4 проби/група. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ спрямо контролата, ANOVA тест. **(c)**. Ефект на CVE и чисти вещества върху експресията на COX-2 в неутрофили от здрави мишки или ZY мишки. Данните представят средно-аритметична стойност \pm SD на MFI при 4 проби/група. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ спрямо контролата, ANOVA тест.

В заключение, растителният екстракт от *C. vulgare* имаше потенциал да модулира функцията на неутрофилите, като ефектите му зависеха от състоянието на клетките (преактивирани или не) и съдържанието на конкретни метаболити (хлорогенова и кафеена киселина) в екстракта.

IV. 3. Модифициране на Nrf2 експресията при човешки гранулоцити и миши неутрофили

За изследване влиянието на екстрактите и/или отделните чисти молекули върху експресията на Nrf2, бяха оптимизирани методите за измерване на протеиновата и генна експресия на Nrf2 в неутрофили. За тази цел бе използван известен Nrf2 активатор – електрофил, синтетичния тритерпеноид CDDO-Me, който съдържа β -ненаситени карбонилни групи в пръстени A и C. Тези групи могат обратимо да взаимодействат с тиоловите групи на Cys остатъците в протеините Keap1 и I κ B киназа, активирайки Nrf2 в неутрофилите на мишки (Thimmulappa et al., 2007). Първо бе определено действието на CDDO-Me върху функцията на Nrf2 в неутрофили от костния мозък на мишки, след което бе изследвано влиянието му върху човешки гранулоцити, диференцирани след 9 дневно третиране със 1% DMSO на миелобластна клетъчна линия HL-60. Ефектът на CDDO-Me върху апоптозата бе оценен според количеството на „нарязан“ PARP-1 в неутрофилите от костен мозък на здрави мишки, активирани със 100 ng/mL LPS в отсъствие или присъствие на 10 nM, 100 nM и 1000 nM CDDO-Me за 18 часа. Активаторът Nrf2 намали по дозозависим начин количеството на срязан PARP-1 в нестимулирани неутрофили, подобрявайки оцеляването и преживяемостта на клетките и показва, че CDDO-Me може да поддържа клетъчното оцеляване при нестимулирани клетки. При стимулирани клетки, ефектът на CDDO-Me беше маскиран от стимулацията с LPS, която по-вероятно задейства анти-апоптогични пътища.

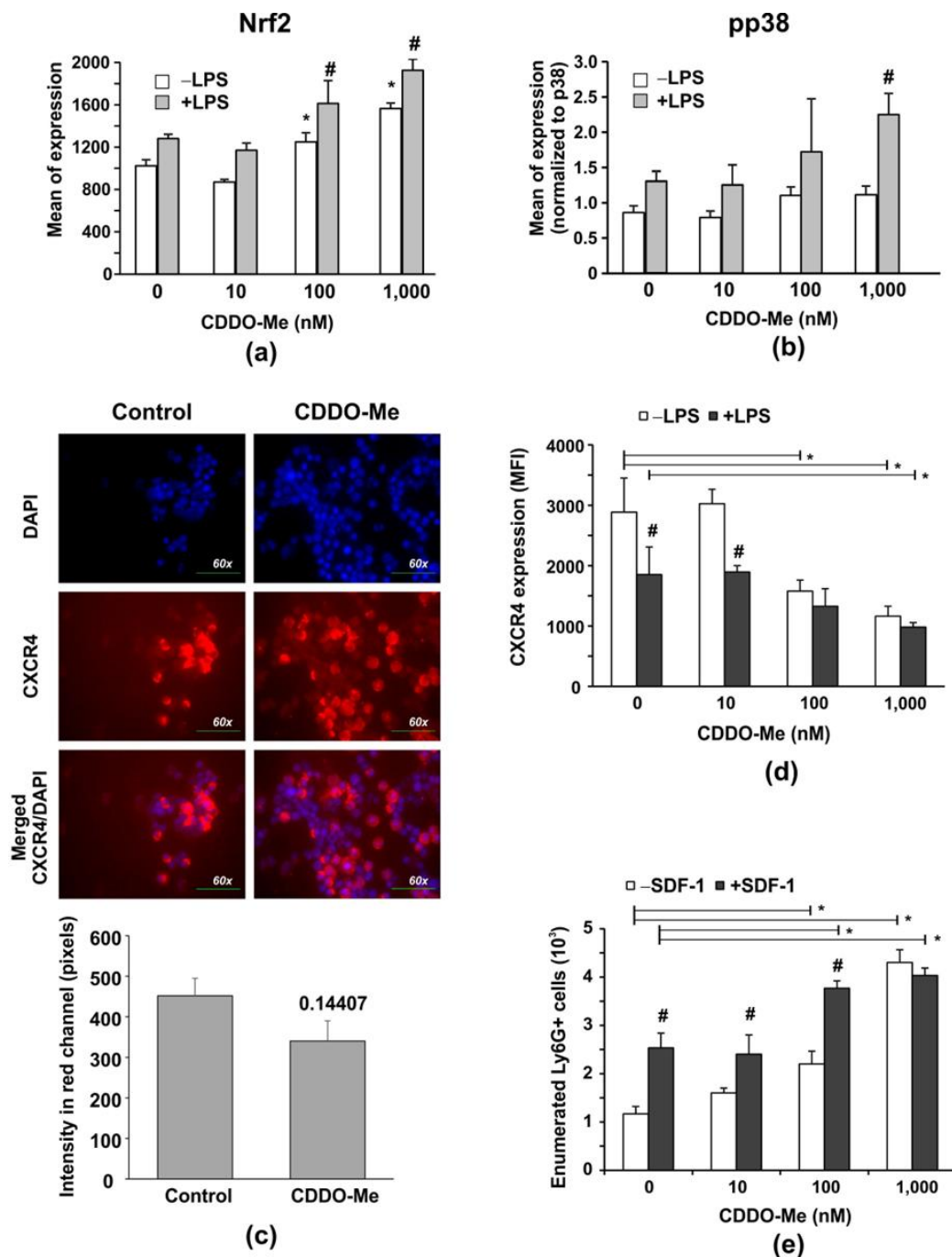
IV. 4. CDDO-Me повишава цитоплазмените нива на Nrf2 и фосфорилирането на p38 и намалява повърхностната експресия на CXCR4 в миши BM неутрофили

За да потвърдим активиращото действие на CDDO-Me върху Nrf2 в нашите експериментални условия, бяха стимулирани костно-мозъчни неутрофили с 100 ng/L LPS в присъствие и отсъствие на нарастващи концентрации на CDDO-Me (10, 100 и 1000 nM) за 6 часа. CDDO-Me покачи нивото на Nrf2 в клетките, дозозависимо както при нестимулирани, така и при LPS-стимулирани клетки (Фигура 2a). В неутрофили, третирани с LPS, но не в нестимулирани клетки, CDDO-Me увеличи нивото на фосфорилираната форма на p38 MAPK при най-високата концентрация на CDDO-Me (Фигура 2b), което показва, че LPS-зависимите сигнални пътища бяха активирани едновременно с активирание на цитоплазмения Nrf2, като фосфорилирането на p38 MAPK бе индиректно повлияно от активатора.

V. 5. Ефект на CDDO-Me върху чувствителността на неутрофили към стареене

Nrf2 играе важна роля при стареенето. При неутрофилите този процес се свързва с придобиване на фенотип на стареене, характеризиращ се с повишена регулация на хемокиновия рецептор CXCR4 (Martin et al., 2003). Експресията на хемокиновия рецептор бе изследвана чрез имунофлуоресценция и проточна цитометрия (Фигура 2c-d). Имунофлуоресцентният анализ показва намалена флуоресценция за CXCR4 в групата, третирана със CDDO-Me за разлика от контролната група (Фигура 2c). При флоуцитометричния анализ беше установено, че стимулацията с LPS (100 ng/mL за 6 часа) повиши експресията на CXCR4 (Фигура 2d), като CDDO-Me индуцира дозозависимо редуциране на повърхностния CXCR4, както в LPS-стимулирани, така и в нестимулирани клетки, потвърждавайки данните от имунофлуоресценцията. Тъй като CXCR4 е рецептор, който регулира трафика на неутрофили от и към костния мозък, според получени сигнали от лиганда му, SDF-1, бе изследван *in vitro* хемотаксиса на неутрофили към SDF-1, в присъствие

и при липса на CDDO-Me (Фигура 2d). ВМ неутрофилите мигрираха към SDF-1 в рамките на 6 часа (Фигура 2e), като CDDO-Me във високи концентрации (100 и 1000 nM) стимулира миграция на клетките към SDF-1 (Фигура 2e).



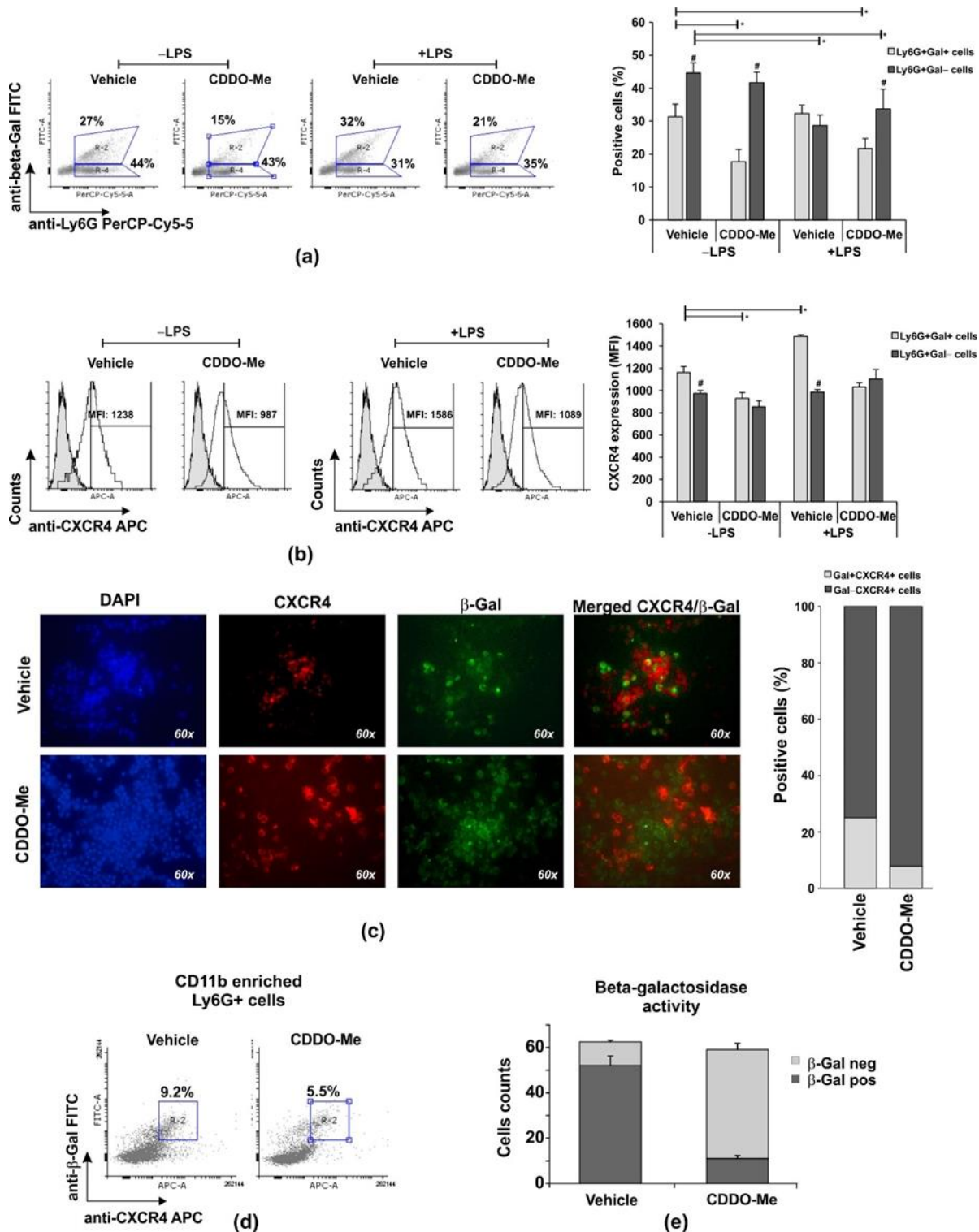
Фигура 2. CDDO-Me повишава нивата на Nrf2 в LPS-стимулираните ВМ Ly6G⁺ неутрофили и намалява експресията на CXCR4, засягайки хемотаксиса към SDF-1 и LPS-медираното фосфорилиране на p38 MAPK. Пречистени ВМ неутрофили бяха стимулирани със 100 ng/mL LPS в присъствието на нарастващи концентрации на CDDO-Me за 6 часа. Протеиновите нива на Nrf2 (a) и на фосфорилиран/нефосфорилиран p38 MAPK (b), съответно, бяха измерени чрез проточна цитометрия. Данните за фосфорилиран p38 MAPK (pp38) протеин (n = 6/група) са нормализирани спрямо тези на общия p38 MAPK протеин (n = 6/група) и представляват средната стойност ± SD от два експеримента, проведени в три повторения (n = 6/група),

#значими р стойности между LPS-стимулирани групи (+LPS), *значими р стойности между нестимулирани (-LPS) групи, ANOVA тест. (c) Имунофлуоресценция за идентифициране та CXCR4 върху ВМ неутрофили култивирани за 6-часа в отсъствие или присъствие на 1000 nM CDDO-Me. Използвани са флуоресцентен микроскоп Leica DM6 с камера DFC7000 T и софтуер LAS \times 5.0.2 (Leica Microsystems; RSR Ltd., София, България) при увеличение $60 \times$ за заснемане на изображения от 5 различни полета на всяка проба. Анализът на изображението беше извършен със софтуер Image J и изразен като интензитет на флуоресценция в червения канал. Графиката показва средно \pm SD на данните ($n = 15$ /група), * числото обозначава р стойност между групите, Student t-тест. (d, e) Пречистени ВМ неутрофили се активират със 100 ng/mL LPS в присъствието на нарастващи концентрации на CDDO-Me в продължение на 6 часа. Повърхностната CXCR4 експресия е показана като интензитет на флуоресценция (MFI) при флоуцитометричния анализ, (d). Данните представляват средно \pm SD от четири експеримента, и трикратни повторения на пробите ($n = 12$ /група). #значими р стойности между нестимулирани (-LPS) и LPS-стимулирани клетки (+LPS), *значими р стойности между третирани с CDDO-Me и нетретирани групи, ANOVA тест. (e) Ефект на CDDO-Me върху хемотаксиса на неутрофили към SDF-1 и преброяване на мигриралите клетки с проточна цитометрия. Данните представляват средната стойност \pm SD от два експеримента в три повторения на проби ($n = 6$ /група). # значими р стойности между -SDF-1 и +SDF-1 групи, ANOVA тест. *значими р стойности между третирани с CDDO-Me и нетретирани групи, ANOVA тест.

ВМ Ly6G⁺ клетки бяха пречистени и обогатени до $\sim 80\%$ CD11b⁺ популация чрез магнитна позитивна селекция (Фигура 3). В тези експерименти бе изследвано действието на CDDO-Me върху стареещия фенотип, характеризиращ се с експресия на CXCR4, както и с експресия и активност на β -галактозидаза, която е основен фактор за поддържане на чувствителност към стареене. Неутрофилите бяха стимулирани или не с LPS (100 ng/mL) в присъствието на 1000 nM CDDO-Me. За да се изследва чувствителността към стареене, клетките бяха събрани след 6 часа и беше определено вътреклетъчното ниво и активност на β -галактозидаза (β -Gal) (Фигура 3a–e) и повърхностната експресия на CXCR4 при клетки експресиращи β -галактозидаза (Фигура 3b–d). Процентът на нестимулирани Ly6G⁺CD11b⁺Gal⁺ неутрофили бе намален два пъти при третиране със CDDO-Me в сравнение с контролната група (Фигура 3a) и бе повишен умерено след стимулация с LPS (Фигура 3a), като CDDO-Me поддържаше този процент при стимулираните клетки (1000 nM; Фигура 3a).

Ly6G⁺Gal⁺ клетките от контролната група показаха по-висока експресия на повърхностен CXCR4, от третираниите със CDDO-Me Ly6G⁺Gal⁺ клетки (Фигура 3b). При ко-локализация на CXCR4⁺ клетки с клетки, които експресират β -галактозидаза чрез имунофлуоресценция, се установи, че Ly6G⁺ CD11b⁺ клетките ко-локализираха по-често CXCR4 и β -Gal, и броят на Gal⁺CXCR4⁺ клетките бе три пъти по-висок в контролната група от този в третираната със CDDO-Me група (Фигура 3c). Допълнителният флоуцитометричен анализ показва, че CDDO-Me намали процента на клетките с изразен фенотип на чувствителност към стареене – senescence, а именно Ly6G⁺CD11b⁺CXCR4⁺Gal⁺, с около 1.8 пъти (Фигура 3e). В подкрепа на тези данни, 83% от клетките показаха активност за β -Gal в контролната група в сравнение със 17% в CDDO-Me-третираната група (Фигура 3d). Данните обобщават, че CDDO-Me инхибира фенотипа за чувствителност към стареене на Ly6G⁺CD11b⁺ неутрофилите.

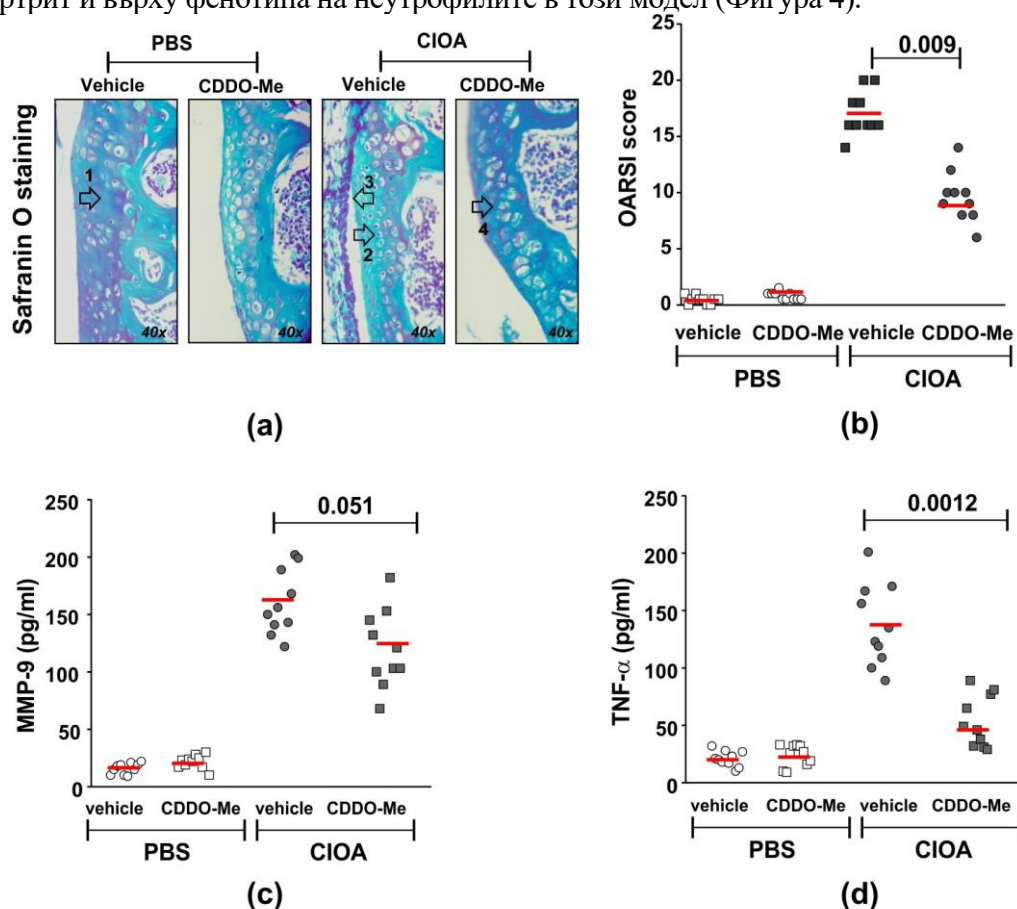
Обобщавайки тези тези данни, можем да заключим, че CDDO-Me инхибира фенотипа на чувствителност към стареене при Ly6G⁺CD11b⁺ неутрофили.



Фигура 3. Ефект на CDDO-Me върху фенотип за чувствителност към стареене на Ly6G+CD11b+ клетки. (a) Данни от представителен експеримент, означаващи процента на пречистени CD11b+ неутрофили, положителни за β -Gal, и резултати на графика, отразяващи средна стойност \pm SD от експерименти проведени в три повторения ($n=6$ /група), *значими р стойности между β -Gal+ групи; # значими р стойности между β -Gal групи, ANOVA тест. (b) CXCR4 експресия върху Ly6G+Gal+ клетки в представителен експеримент и на графиката, данни за средната стойност \pm SD от два експеримента, с три повторения ($n=6$ /група), *значими р стойности между β -Gal групи, ANOVA тест. (c) Ко-локализация на CXCR4 и β -

Gal в неутрофили, изследвана с флуоресцентен микроскоп. Графиката представя съотношението на двойно положителните клетки от общо 60 клетки/поле ($n = 6$ /група). (d) Представителни хистограми от шест в група, демонстриращи ефекта на 1000 nM CDDO-Me върху процента на Ly6G+CD11+CXCR4+Gal+ неутрофили, (e) Ефект на 1000 nM CDDO-Me върху броя на CD11b+ неутрофили, положителни за β -галактозидазна активност, изследвани с Leica DMi8 инвертен микроскоп при 10 \times и 20 \times увеличение. Данните представляват средноаритметична стойност \pm SD от два експеримента, с проби в три повторения ($n = 6$ /група).

In vitro данните показват, че CDDO-Me може да влияе на експресията на Nrf2 в неутрофилите на мишки от костен мозък и да повлияе на придобиването на фенотип, свързан със стареене, както и на тяхната чувствителност към стареене. Следващите експерименти CDDO-Me е изследван *in vivo* при процесите на дегенерация, свързани със стареещ фенотип. Остеоартритът е заболяване, което се свързва с придобиването на стареещ фенотип на хондроцитите. В патологията на дегенеративното заболяване, играят роля и неутрофилите, които са източник на ROS и възпалителни медиатори, и проявяват фагоцитна функция, след активиране от интензивни сигнали за опасност, получени от посредством вродени рецептори (Manukan et al., 2017). В предишни изследвания се установява и че, отстраняването на неутрофилите, може да подобри заболяването, като се ограничи неговата прогресия (Benigni et al., 2017). В следващите експерименти бе проучен ефекта от локално приложение на CDDO-Me върху протичането на CIOA, модел за индуциране на нестабилност в ставата, водещ до остеоартрит и върху фенотипа на неутрофилите в този модел (Фигура 4).



Фигура 4. Ефект на CDDO-Me върху активността на CIOA и производството на MMP-9 и TNF- α в синовални екстракти. CIOA се индуцира в Balb/c мишки чрез вътреставно инжектиране на 5 U/10 μ L колагеназа от *Clostridium histolyticum* (CIOA група) или 10 μ L PBS

(PBS група). (a) Представителни фотографии на хрущял от tibia с хондроцити, от оцветени със Safranin O срези на колянна става, изолирана от CDDO-Me третирани или контролни CIOA мишки. Стрелките посочват: (1) протеогликан, (2) хондроцитна апоптоза, (3) възпаление и (4) хондроцитна пролиферация. Изображенията са заснети при наблюдение със светлинен микроскоп при увеличение 40×. (b) Ефект на CDDO-Me върху хистологичната OARSI оценка, извършена под светлинен микроскоп при 20× и 40× увеличение на оцветени със Safranin O срези на колянна става, значимост p между третирани със CDDO-Me и нетретирани групи ($n = 10$ /група), ANOVA тест. (c) Ефект на CDDO-Me върху секрецията на MMP-9 в синовиални екстракти от ден 14 на CIOA, p между третирани и нетретирани групи със CDDO-Me, Student t -тест. (d) Ефект на CDDO-Me върху секрецията на TNF- α в синовиални екстракти от ден 14 на CIOA, значимост p между третирани със CDDO-Me и нетретирани групи ($n = 10$ /група), ANOVA тест.

CDDO-Me бе инжектиран вътреставно в Balb/c мишки, два пъти седмично, започвайки на ден 7 след CIOA. На 14-ия ден ставите бяха събрани и използвани за хистология или приготвяне на синовиални екстракти. Наблюдавано бе намаление в загубата на протеоглигани и локално възпаление при мишки със CIOA, което доведе до значимо редуциране на оценката за ставно увреждане - OARSI в групата, третирана с CDDO-Me в сравнение с контролната група (Фигура 4a, b). Подобряването на хистологичните параметри бе придружено от инхибиране на локалната секреция на MMP-9 (Фигура 4c) и TNF- α (Фигура 4d).

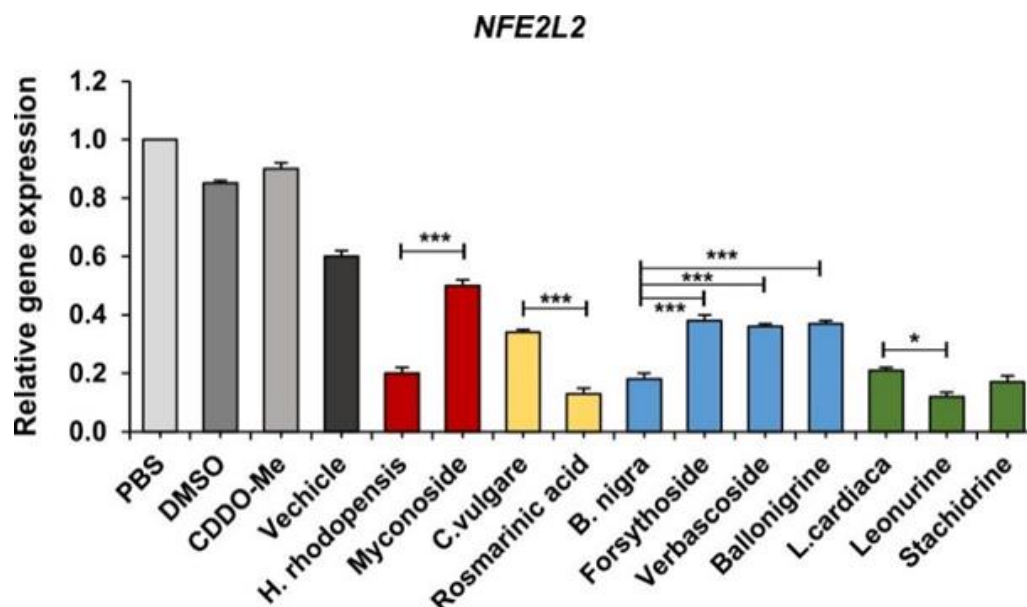
В допълнение, беше измерена експресията на CXCR4 върху терминално диференцирани и зрели CD11b^{hi} неутрофили и получените резултати бяха подложени на корелационен анализ с данните от OARSI оценката на увреждането в колянната става на всяка мишка. На ден 7 и ден 14 корелационните коефициенти на Pearson, изчислени за групата CIOA, отчетоха силна положителна корелация (степен на свобода 16, $\alpha = 0.05$) между двата параметъра, а именно корелация между активността на заболяването и експресията на CXCR4 върху неутрофили с $r=0.625$ на ден 7 и $r=0.916$ на ден 14 от CIOA, съответно. Данните показваха, че прогресията на заболяването беше свързана с придобиването на стареещ фенотип на CXCR4+CD11b^{hi} неутрофили в костния мозък.

V.6. Ефект на растителни екстракти върху експресията на Nrf2 на протеиново и транскрипционно ниво в неутрофили.

В следващите експерименти, HL-60 клетъчната линия бе култивирана до експоненциална фаза на растеж. Клетките бяха третирани с PBS (недиференцирани клетки) или третирани с 1% DMSO за диференциране до гранулоцити в отсъствие или присъствие на CDDO-Me (1 μ M). На ден 1, 3, 5 и 7 бе обновявана средата. На 9-ти ден от началото на диференциацията, клетките бяха стимулирани със 100 ng/mL LPS, за активиране на NF- κ B сигналния път, регулиращ експресията на Nrf2 гените. Динамиката на експресия показва, че в първите няколко минути до 1 час от добавянето на 1% DMSO се намали иРНК транскриптите за *NFE2L2*, като след 3ти час транскрипцията постепенно нараства, а след 12 до 24 часа бе наблюдавана значима *de novo* транскрипция на гена. При добавяне на CDDO-Me се промени динамиката на *NFE2L2* експресията – наблюдавано беше „осцилиране“ на транскрипцията.

В следващ експеримент бе изследвана експресията на *NFE2L2* гена в диференцирани гранулоцити до 9ти ден и стимулирани в присъствие на растителни екстракти и чисти вещества за 4 часа, времева рамка, в която започва да се повишава експресията на гена. В експериментите бяха използвани растителни екстракти, които бяха първоначално разтворени в 50% метанол/PBS и след това тези работни разтвори бяха разредени с PBS до концентрация 200 μ g/mL. Затова в експериментите бе включена и контрола с разтворител, метанол (vehicle). Чистите вещества бяха разтворени в DMSO и приложени в концентрация от 1 μ M (Фигура 5).

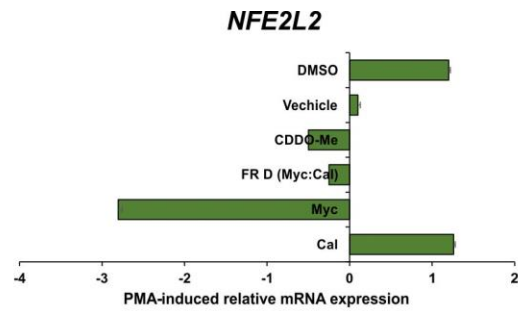
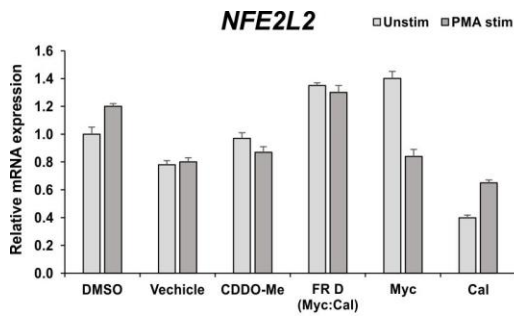
Нивото на транскриптите за *NFE2L2* гена е променено под действие на растителните екстракти и чистите вещества. Експресията на гена е увеличена от миконозид спрямо растителния екстракт от *H. rhodopensis*; от форситозид, вербаскозид и балонигрин спрямо растителен екстракт от *B. nigra* и е понижена от леонурин и стахидрин в сравнение с екстракт от *L. cardiaca*.



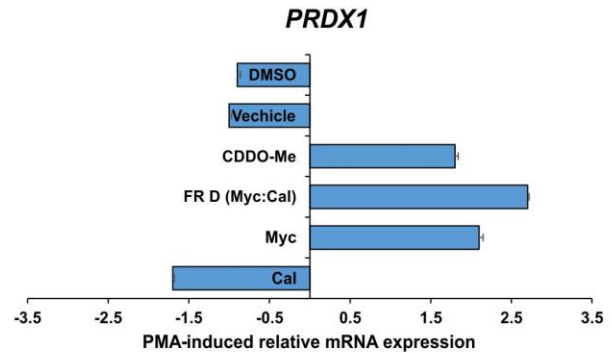
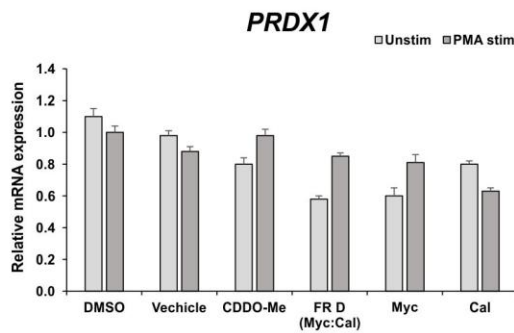
Фигура 5. Експресия на *NFE2L2* гена в диференцирани гранулоцити, третирани за 4 часа с растителни екстракти от *H. rhodopensis*; *B. nigra*, *L. cardiaca*, *C. vulgare* и чисти вещества CDDO-Ме, миконозид, розмаринова киселина, форситозид, вербаскозид, балонигрин, леонурин и стахидрин. Нивото на *NFE2L2* иРНК транскриптите е изследвано чрез RT-qPCR и нормализирано спрямо референтен ген (тубулин, TUBB). Данните са представени като средноаритметична стойност \pm SEM от три независими експеримента, в три технически повторения.

V. 7. Ефект на екстракт от *H. rhodopensis*, фракции и чисти вещества върху експресията на Nrf2 на протеиново и транскрипционно ниво в човешки гранулоцити

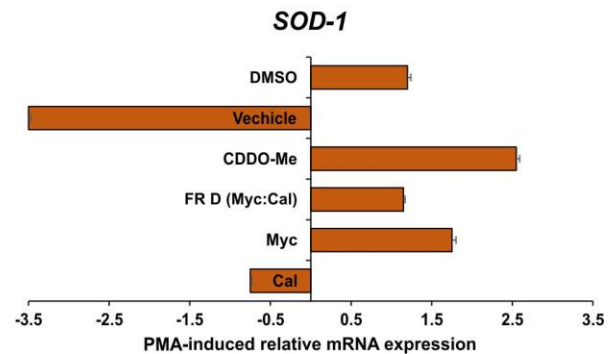
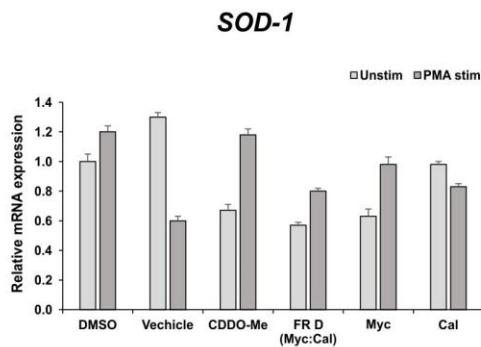
Пилотният експеримент показва, че растителния екстракт от *H. rhodopensis* повлиява експресията на Nrf2 на транскрипционно и транслационно ниво, като този ефект може да се свърже с наличието на миконозид в екстракта. За да се потвърди тази хипотеза, екстракта от *H. rhodopensis* бе фракциониран и активните съединения във фракциите бяха идентифицирани. Получените фракции D и E се различаваха по съотношението на двете вещества, миконозид и калцеолариозид E, съотношение 1:0.6 и 0.25:1, съответно. В тези експерименти клетките бяха стимулирани с PMA, тъй като в предишни експерименти установихме, че този стимул може да повиши вътреклетъчното ниво на Nrf2. Изследвана бе PMA-индуцираната иРНК експресия на *NFE2L2* гена и Nrf2 таргетните гени *PRDX1* и *SOD-1* (Фигура ба-с).



(a)



(b)



(c)

Фигура 6. Ефект на фракция D, миконозид и калцеолариозид E върху експресията на *NFE2L2* гена (a) и Nrf2 таргетните гени (b) *5-PRDX* и (c) *SOD-1*, както и PMA-индуцираната експресия на гените в диференцирани гранулоцити стимулирани за 4 часа с PMA. Миконозид бе в концентрация 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, калцеолариозид E в концентрация 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ и фракция D 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Нивото на иРНК транскрипти бе изследвано чрез RT-qPCR и бе нормализирано спрямо референтен ген (тубулин, *TUBB*). Данните са представени като средно-аритметична стойност \pm SEM при два независими експеримента, в три технически повторения.

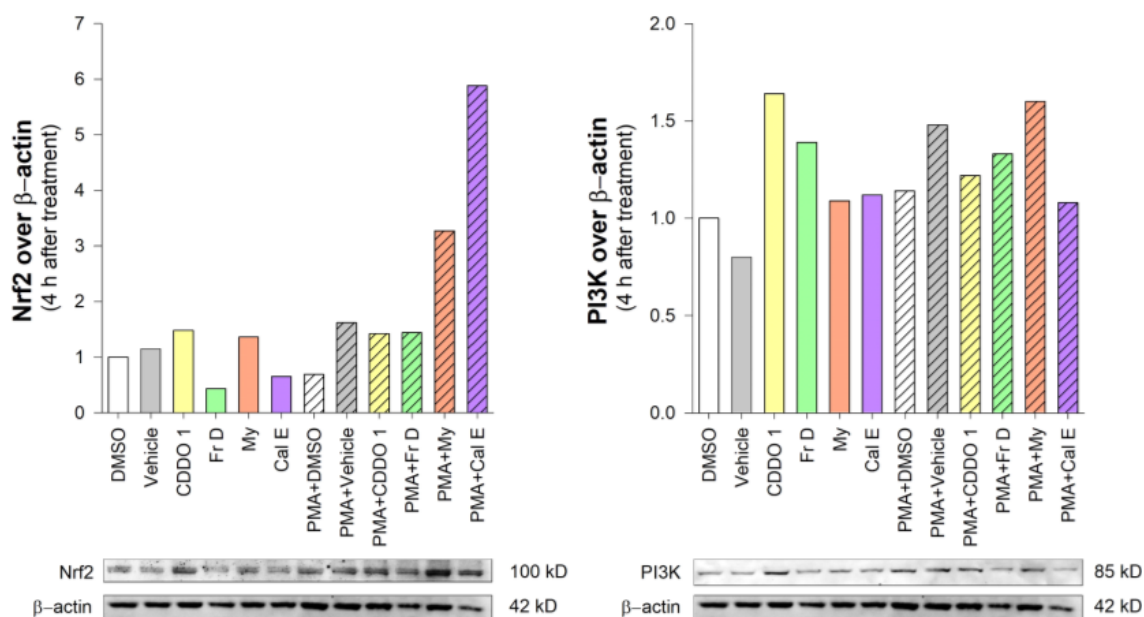
Гените за пероксиредоксин (PRDXs) са силно-индуцируеми при оксидативен стрес. Продуктите на тези гени са ензими, които участват в редуцията на пероксиди с помощта на тиоредоксин или глутаредоксин, и в окислението на цистеина, като така регулират антиоксидантния глутатионов метаболитен кръг. Те могат да действат като шаперони и регулатори на сигналната трансдукция (Rhee et al., 2005; Mullen et al., 2015). *PRDX1* генът има ниска експресия в костния мозък в сравнение със слезката. Установено е, че *PRDX1* и *PRDX2* се експресират след активиране с LPS или TNF- α и могат да засегнат продукцията на IL-1 β и инфлазомата (Mullen et al 2015). По отношение на диференцираните човешки гранулоцити от линия HL-60 се счита, че те експресират по-слабо *PRDX1* от човешките неутрофили (Rison et al 2018), както и недиференцираните клетки от тази линия показват по-висока експресия на

PRDX1 от диференцирани с DMSO HL-60 клетки (Rincon et al. 2018). Това изследване бе потвърдено в настоящата дисертация, като в допълнение беше наблюдавано около 1.5 пъти понижаване в експресията на *PRDX1* при третиране на диференцираните клетки с CDDO-Me спрямо недиференцираните (pre) клетки.

Генът *SOD-1* кодира ензимът Си/Zn супероксид дисмутаза 1, който превръща супероксидните йони в пероксид. Този ензим е свързан с клетъчната апоптоза и обезвреждането на ROS при оксидативен стрес. Крайният продукт от действието на *SOD-1*, H_2O_2 , повишава транспорта на Nrf2 в ядрото, но не променя свързването на Nrf2 за *SOD-1* промотора (Dell'Orco et al., 2016). *SOD-1* експресията е по-ниска в диференцирани с DMSO HL-60 клетки от недиференцирани (Rincon et al., 2018), а експресията в диференцираните клетки е сравнима с тази на миши неутрофили от периферна кръв (Rincon et al., 2018). В настоящата работа се наблюдава 1.6 пъти намаление в транскрипцията на *SOD-1* в диференцирани гранулоцити, след третиране със CDDO-Me, спрямо диференцираните, но нетретираните с веществото клетки. CDDO-Me засяга експресията на гени от редукционния метаболизъм (*PRDX1*) и антиоксидантната защита (*SOD-1*) в диференцирани човешки гранулоцити след третиране в рамките на 4 часа, и в динамика, която следва експресията на *NFE2L2* гена.

Фракция D и миконозид стимулираха експресията на *NFE2L2* гена в нестимулирани гранулоцити (Фигура 6a), но те обратно повлияха PMA-индуцираната експресия на гена (Фигура 6a). Транскриптите за двата Nrf2 таргетни гена *PRDX1* и *SOD-1*, бе намалена спрямо контролата с метанол, но миконозид и съответно фракцията, повишиха експресията на гените и повлияха позитивно PMA-индуцираната транскрипция (Фигура 6b,c). Ефектът на миконозид бе подобен на този от синтетичния Nrf2 активатор CDDO-Me. Калцеолариозид Е показва обратен ефект върху експресията на *NFE2L2* и на таргетните гени при сравнение с миконозид (Фигура 6b-c). Той понижи експресията на *NFE2L2* гена в нестимулирани и стимулирани гранулоцити в сравнение с контролната група, третирана с метанол, но позитивно регулира транскриптите при стимулиране с PMA (Фигура 6a-c).

Данните от имуноблот анализа показаха, че PMA-индуцира експресия на гена за *Nrf2*, но това бе свързано с намалено ниво на протеина в клетъчните лизати, вероятно поради активиране и транспорт към ядрото (Фигура 8a).

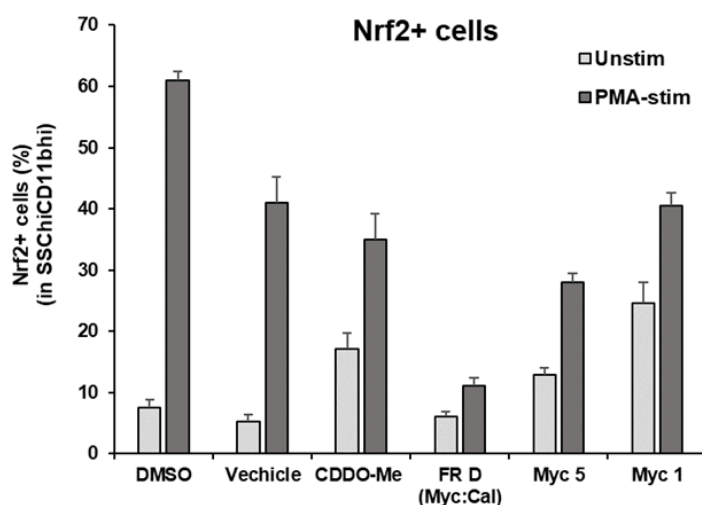


Фигура 8. Ефект на на фракция D, миконозид и калцеолариозид Е върху експресията на *Nrf2* (a) и *PI3K* киназа (b) при стимулиране с PMA за 4 часа. Нивото на протеините е определено с

имуноблот и е нормализирано спрямо референтен протеин β -актин чрез използване на софтуер The ChemiDoc MP imaging system (Bio-Rad) and Image Lab software 6.0.1 (Bio-Rad)

В рамките на периода се забеляза леко повишено ниво на PI3K, вероятно поради *de novo* синтез и поддържащо фосфорилиране/дефосфорилиране, в отговор на стимула. Фракция D повишава експресията на *NFE2L2* гена, като този ефект се оказва независим от PMA стимулацията, както и бе свързан с ниско ниво на експресия на Nrf2 протеиново ниво. Фракцията обаче повишава нивото на PI3K, което показва, че може да задейства алтернативни пътища за активиране (Фигура 8a, b). Калцеолариозид Е предизвиква PMA индуцирана експресия на *NFE2L2* гена, като повишава и протеиновото ниво на Nrf2, и не променя значимо нивото на PI3K (Фигура 8a, b). Миконозид има противоположно действие, като намалява транскриптите *NFE2L2* в PMA стимулирани клетки и поддържа ниво на Nrf2 протеина, по-високо от това на CDDO-Me. Вероятно този ефект се дължи по-скоро на стабилизиране на експресията на Nrf2 чрез други сигнални пътища, тъй като миконозид повишава експресията PI3K при спрямо CDDO-Me (Фигура 8a, b).

При по-продължително третиране в рамките на 18 часа, в период когато Nrf2 се стабилизира на генетично ниво, и активирането му в цитоплазмата и транслокацията му ядрото може да се поддържа в баланс, третирането на диференцирани гранулоцити с миконозид в различни концентрации повишиха процента на Nrf2⁺ клетки при нестимулирани клетки и поддържаха тяхния брой в PMA стимулирани гранулоцити, подобно на CDDO-Me (Фигура 9).



Фигура 9. Ефект на фракция D и миконозид върху процента на Nrf2⁺ диференцирани гранулоцити. Диференцирани човешки гранулоцити (ден 9) са стимулирани или не с PMA за 18 часа в присъствие или липса на фракция D (200 μ g/mL) и миконозид в концентрации 5 μ M (Myc 5) и 1 μ M (Myc 1) и CDDO-Me (5 μ M). Процентът на Nrf2⁺ клетки бе определено в популацията от SSC^{hi}CD11b^{hi} гранулоцити с проточна цитометрия. Данните са представени като средноаритметична стойност \pm SD при два независими експеримента.

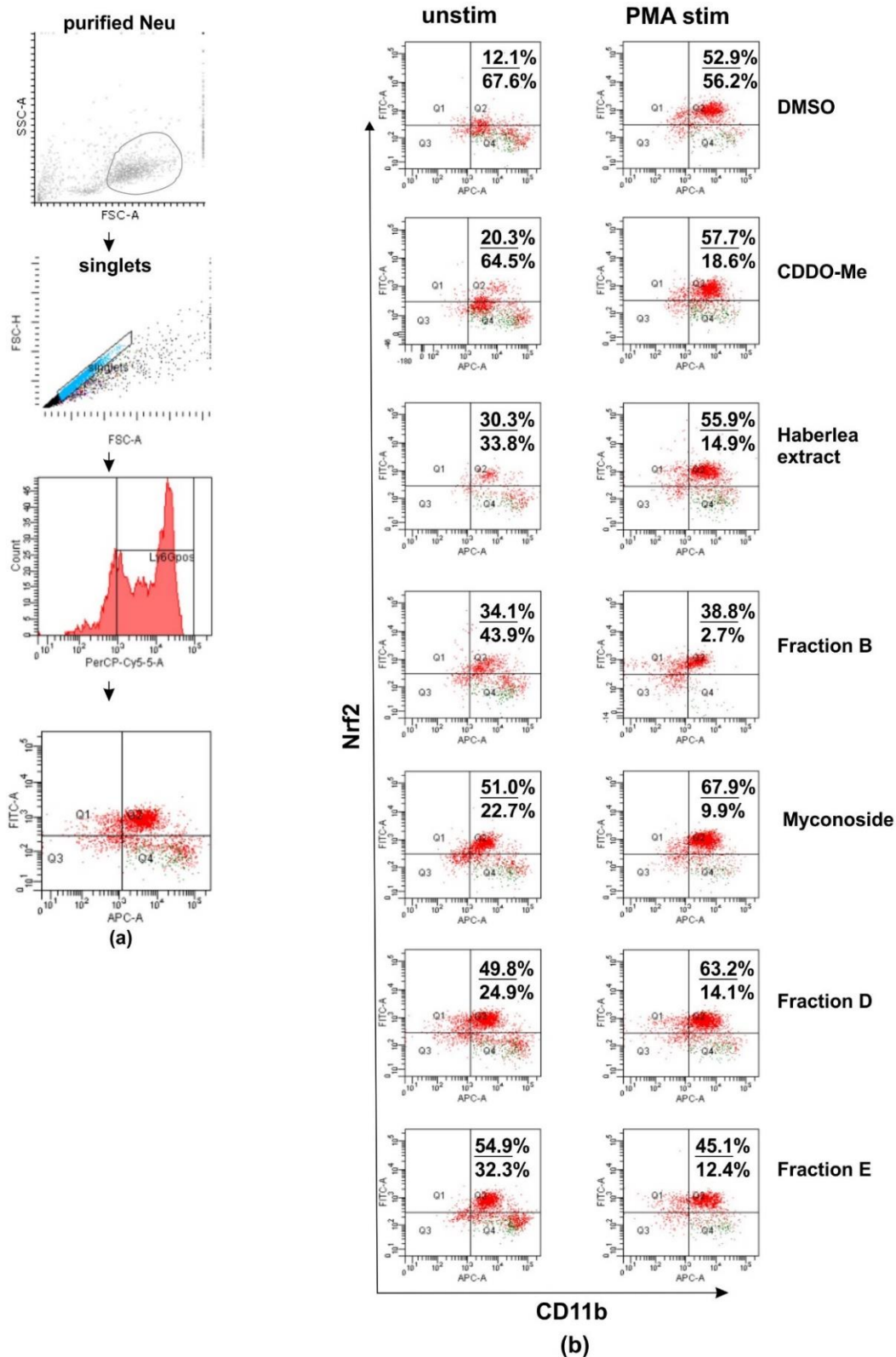
Предполагаме, че Nrf2⁺ клетки са по-малко чувствителни на стареене, и поддържането им вероятно е причинено от активиране на сигнални пътища, които при по-продължителна стимулация задействат механизми за стареене и/или апоптоза. Този ефект е по-вероятно да е независим от способността на миконозид да стабилизира Nrf2 при краткосрочно активиране (Фигура 9).

В следващите опити се проследи ефектът на различните фракции и изолирани чисти вещества върху Nrf2 експресията в миши ВМ неутрофили. Според наличните бази данни,

зрелите неутрофили поддържат висока обща активност в стационарно състояние на ендогенния Nrf2 и силно експресират Nrf2 (Joshi and Werner 2017). В настоящото изследване бяха изолирани и стимулирани ВМ неутрофили с РМА в продължение на 16 часа в присъствието на екстракт от *H. rhodopensis* (200 µg/mL), фракции (200 µg/mL), миконозид (5 µM) и CDDO-Me (5 µM). В използвания протокол изследването бе ограничено до Ly6G+CD11b+ неутрофили, като бе забелязано, че има висока и ниска експресия на CD11b върху Ly6G+ клетките (Фигура 10a). При контролата на третирани с DMSO, но нестимулирани клетки, се идентифицира базовото ниво на Nrf2 в 12.1% от CD11b+неутрофили (Фигура 10b). Миконозид повиши вътреклетъчна експресия на Nrf2 в CD11b+неутрофили, като този ефект бе по-силен от този на CDDO-Me (Фигура 10b). Фракциите В, D и Е, повишиха процента на CD11b+Nrf2+неутрофили, което предполага, че те съдържат съединения, индуктори на експресията на Nrf2. Основното вещество във фракция В бе миконозид, докато фракции D и Е съдържаха калцеоларозид Е в специфично съотношение спрямо миконозид. Резултатите предполагат синергично действие на миконозид и калцеоларозид Е върху пътища, отговорни за експресията на Nrf2, и това бе свързано с около 2.5 пъти увеличение на експресията на Nrf2 при сравнение с CDDO-Me (Фигура 10b).

Стимулирането на неутрофили с РМА повиши процента на CD11b+Nrf2+ неутрофили във всички групи в сравнение със съответните нестимулирани групи (Фигура 10b). Миконозид и фракция D повишиха ендогенния Nrf2, индуциран след стимулацията с РМА, в по-голяма степен, отколкото CDDO-Me (Фигура 10b), въпреки че стимулите през РМА може да маскират действието на фракцията и екстракта, като задействат алтернативни пътища, водещи до силна цитоплазмена Nrf2 експресия, както е показано от други автори (Joshi and Werner 2017). В извод, фракция В, която съдържа основно миконозид, както и самия миконозид, имаха силен ефект върху експресията на Nrf2 в ВМ неутрофили. Фракциите Е и D показаха подобен стимулиращ ефект върху ендогенния Nrf2 въпреки факта, че съдържаха различно съотношение на основните съединения миконозид и калцеоларозид Е. ВМ неутрофилите бяха инкубирани в продължение на 16 часа с фракции В, D, Е, и чистите съединения, и в концентрации, съответстващи на съотношението на веществата във съответно фракции D и Е. Клетките, инкубирани с фракция В (200 µg/mL), съдържаща предимно миконозид, подобриха преживяемостта на неутрофилите и повишиха вътреклетъчното ниво на Nrf2. Миконозид в концентрация от 32 µg/mL, която бе над шест пъти по-ниска от съдържанието на миконозид във фракция В, не успя да покаже толкова силен ефект върху клетъчната преживяемост и върху процента на Nrf2+ неутрофили. Съответно, ниската доза миконозид от 8 µg/mL, аналогична на съдържанието му във фракция Е, индуцира Nrf2 експресия само в 16% от неутрофилите.

При анализ на фракция D, бе установено че съдържа двете основни съединения, миконозид и калцеоларозид Е в съотношение 1:0.6. Наблюдаваше се по-добро оцеляване на неутрофилите и увеличени проценти на Nrf2+ клетки след 16 часа култивиране в присъствието на фракция D в сравнение с CDDO-Me (Фигура 10b). Чистите съединения, комбинирани в същото съотношение с това във фракция D, повлияха клетъчната преживяемост и ендогенното ниво на Nrf2 по подобен начин (Фигура 10b). Съответно, получените данни показаха, че както миконозид, така и калцеоларозид Е имаха стимулиращо действие върху вътреклетъчната експресия на Nrf2 (Фигура 10b). Интересно бе, че процентът на Nrf2+ клетките след третирането с фракция Е, която съдържа калцеоларозид Е и миконозид в съотношение 0.25:1, бе подобен на този на групата, третирана с фракция D (Фигура 10b). Освен това, пречистен калцеоларозид Е (при концентрация от 32 µg/mL) бе охарактеризиран като по-силен индуктор на Nrf2 в неутрофили от миконозид (при концентрация от 32 µg/mL).



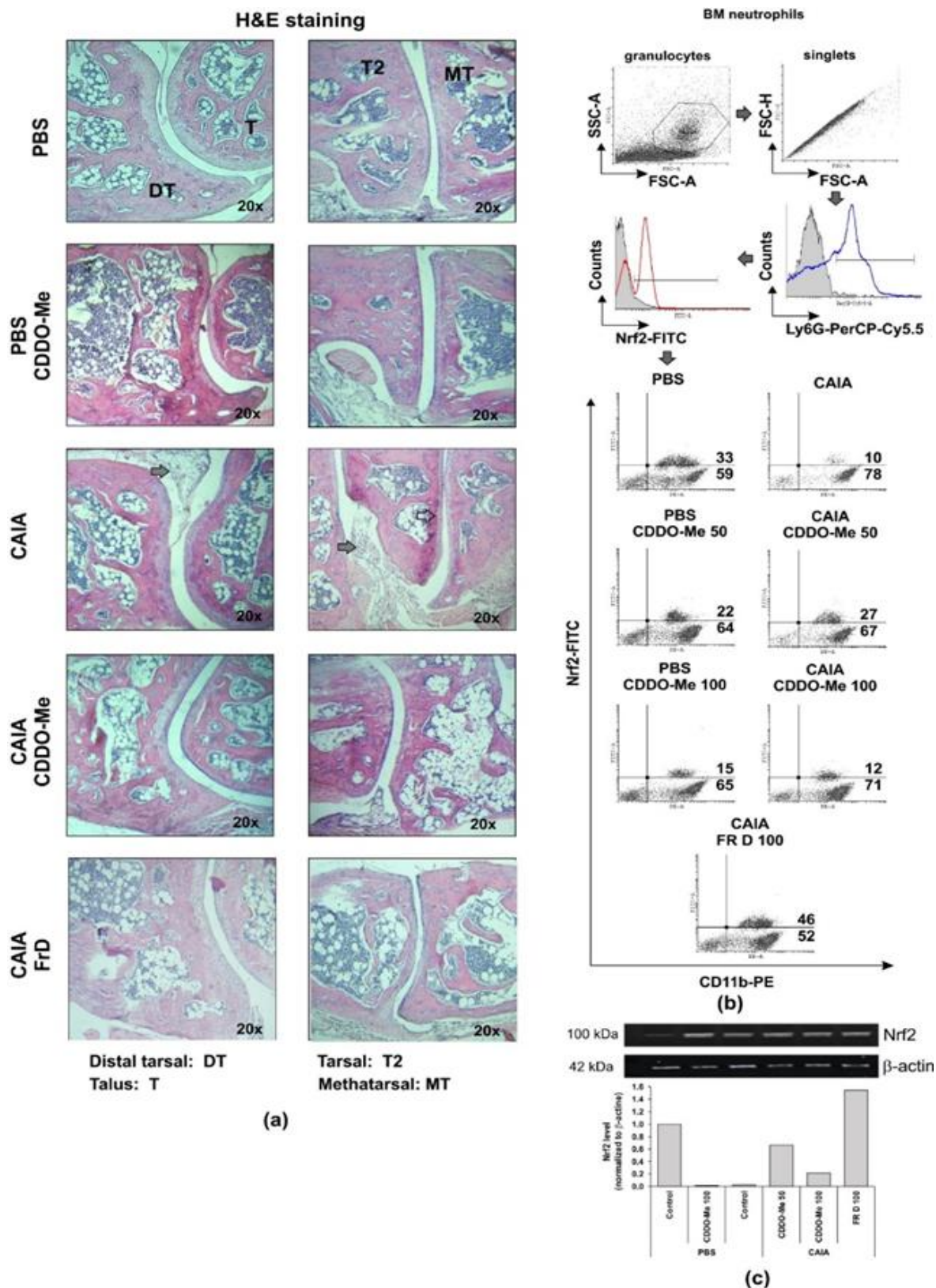
Фигура 10. Ефект на екстракт от *H. rhodopensis*, фракции и чисти вещества върху експресията на Nrf2 на протеиново ниво в миши неутрофили чрез проточна цитометрия. (a) Стратегия на анализ, включваща елиминиране на дублети и ограждане на CD11b⁺ клетки в популацията. (b) Dot-plot изображения с процент на CD11b⁺Nrf2⁺ неутрофили, нестимулирани или стимулирани с PMA за 16 часа. Анализът е извършен в четири квадранта, означени съответно с цифри в горния десен ъгъл, а именно - Q1: CD11b⁻ Nrf2⁺, Q2: CD11b⁺Nrf2⁺, Q3:

CD11b⁻Nrf2⁻ и Q4: CD11b⁺Nrf2⁻. Числата в изображението показват процента на CD11b⁺Nrf2⁺ клетки/CD11b⁺Nrf2⁻ клетки.

В следващите експерименти фракция D и чистите вещества бяха инжектирани в модел на анти-колаген антитяло индуциран артрит при мишки. В този модел след пасивният трансфер на антителата и начална автоимунна реакция, неутрофилите играят важна роля в развитието на възпалителния процес и деструкцията на костта. Мишките бяха инжектирани интраперитонеално с ArthritoMab™ (200 µL/мишка) на ден 0, последвано от интраперитонеално инжектиране на LPS на ден 3 за усилване на стерилното възпаление. На ден 5 от индуциране на артрит, мишките бяха инжектирани интраперитонеално с фракция D и чисти вещества, миконозид и калцериозид, както и активатора CDDO-Me.

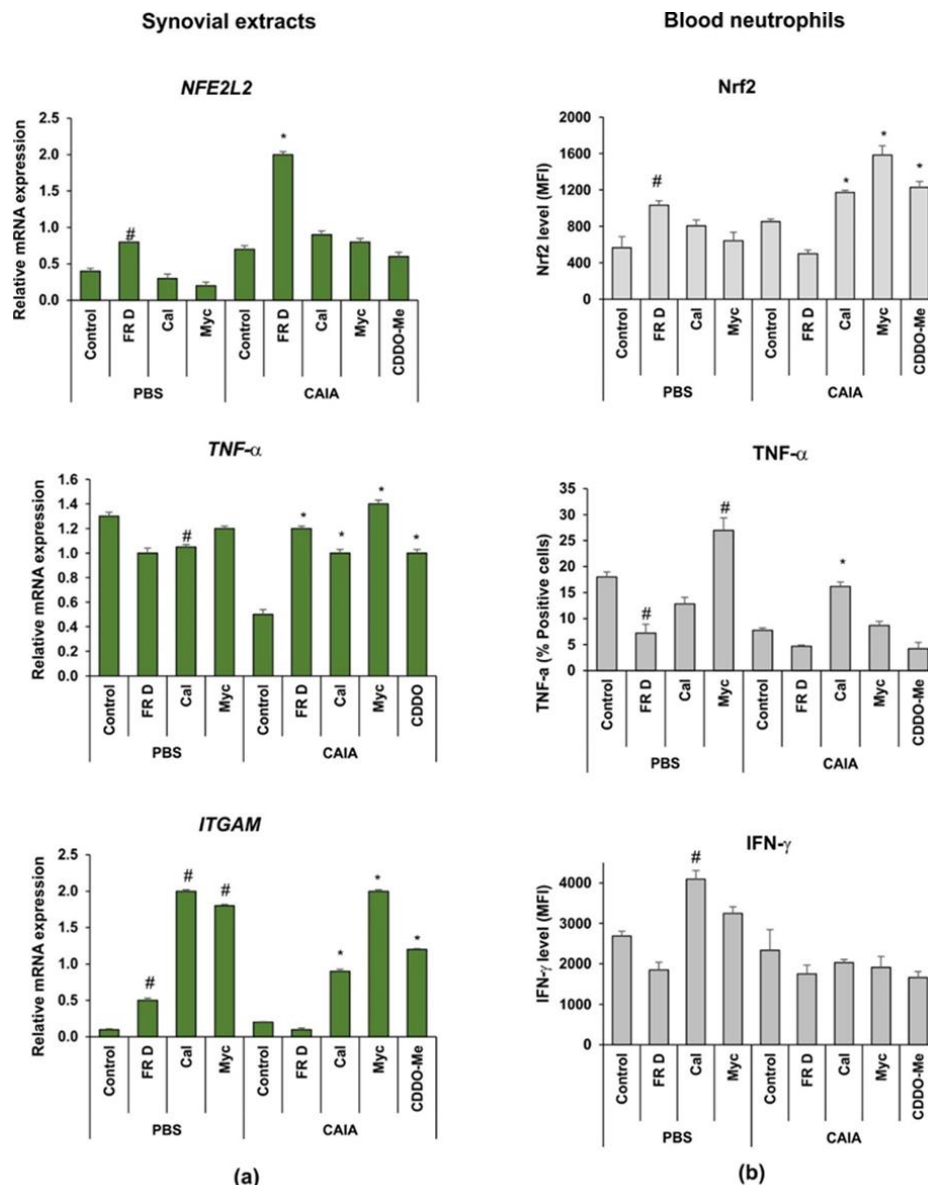
В първия пилотен експеримент CDDO-Me бе приложен в доза от 50 и 100 µg/мишка, а фракция D в една доза от 100 µg/мишка, а в следващите експерименти бяха приложени и чистите вещества миконозид и калцеолариозид E в доза от 100 µg/мишка. Всеки ден в рамките на 7 дни бе проследявано теглото на мишките, подуването в задните лапи и цялостното състояние на животните. На ден 8 бяха събрани лапи за хистологичен анализ на глезенни стави и бяха приготвени синовиални екстракти, и костен мозък и кръв за фенотипизиране и проследяване на нивото на Nrf2, NF-κB и продукцията на възпалителни цитокини TNF-α и IFN-γ в миши неутрофили. Значима промяна в теглото на мишките не бе установена. Левите задни лапи бяха събрани за приготвяне на срези от глезенна става, като при микроскопското изследване и след оцветяване с H&E, бяха проследени промените в два региона, между дисталната тарзална кост и талуса и между тарзалната и метатарзалната кост (Фигура 11). Инжектирането на LPS доведе до подуване на лапите на ден 4 в групата, инжектирана с коктейл от антитела, но не и в PBS групата. Установихме клетъчна инфилтрация в двата региона при CAIA мишките, което беше по-ясно изразено в региона между тарзална и метатарзална кост при сравнение с тази в областта на талуса. Ние не установихме, значимо увреждане на хрущяла, вероятно поради ранния период на събиране на пробите – ден 7. Третирането с CDDO-Me или фракция D, намалява възпалението в наблюдаваните региони (Фигура 11a). От същите животни бяха изолирани костно-мозъчни неутрофили и бяха подложени на флоуцитометричен и на Western блот анализ за експресия на протеина Nrf2 (Фигура 11b, c). При групата CAIA, процентът на Ly6G⁺ CD11b⁺Nrf2⁺ беше почти 3 пъти по-нисък от този в контролната група. Третирането с CDDO-Me в PBS групата предизвиква дозозависимо намаление на клетките, които експресират Nrf2 (Фигура 11b, c). При CAIA, ниската доза CDDO-Me и фракция D повишават процента на Ly6G⁺CD11b⁺Nrf2⁺ неутрофили. Този резултат бе потвърден и от денситометричния анализ на имуноблота за Nrf2 (Фигура 11c). Данните от този пилотен експеримент предполагат, че фракция D има потенциал за повишаване на вътреклетъчното ниво на Nrf2 и броя на Nrf2⁺ клетки в популацията от костно-мозъчни неутрофили.

На ден 8 бяха събрани костен мозък, кръв и десните лапи на мишките, от които се приготвят синовиални екстракти. Кръвните проби бяха подложени на лизис и проточна цитометрия за определяне експресия на Nrf2 в популацията на Ly6G⁺CD11b⁺ клетки и вътреклетъчното ниво на TNF-α и IFN-γ. Синовиалните екстракти бяха използвани за изолиране на РНК и количествено определяне на транскриптите за *NRF2*, *TNF-α* и *ITGAM*, кодиращ експресията на CD11b в комплекса Mac-1 (Фигура 12a,b). Установено бе, че фракция D, повиши нивото на Nrf2, както в синовиалните екстракти от здрави, така и от CAIA мишки (Фигура 12a). Подобни резултати бяха наблюдавани и при експресията на Nrf2 в циркулиращи неутрофили (Фигура 12b). Докато миконозид, калцеолариозид E и CDDO-Me намалиха експресията на гена в синовиални екстракти, в неутрофили от кръв, имаше повишен брой Nrf2⁺ клетки. Това показва, че ефектът на веществата бе локален и зависеше от спецификата на засегнатата тъкан.



Фигура 12. Хистология на глезенна става (a), процент на Nrf2⁺ клетки (b) и експресия на Nrf2 (c) в костно-мозъчни неутрофили от мишки с CAIA, третирани с CDDO-Me (100 и 50 μ g/мишка) и фракция D (FrD; 100 μ g/мишка). Мишките са инжектирани с ArthritisMab (200 μ L/мишка) на ден 0 и LPS (200 μ L/мишка) на ден 3. Третирани са 2 пъти през ден и на ден 8 левите задни лапи и дясна бедрена кост са събрани. Хистологичните срези бяха

оцветени с Н&Е и наблюдавани под микроскоп при увеличение 20× и фотографирани с микроскопска камера, в два региона дистална тарзална кост/талус и тарзална кост/метатарзална кост. Стрелките означават местата, в които се идентифицира клетъчна инфилтрация. (b) Костно-мозъчните неутрофили са подложени на флоуцитометричен анализ, при който са оградени последователно гранулоцитите по размер, синглетни клетки, LybG⁺ клетки. Dot-plot изображения с процент на CD11b⁺Nrf2⁺ клетки от четири мишки/група (n=4). (c) Имуноблот за определяне на Nrf2 в костно-мозъчни неутрофили. Данните са нормализирани спрямо нивото на референтен протеин β-актин и денситометричен анализ е извършен посредством софтуер Image Lab 6.0.1 (Bio-Rad).



Фигура 13. Експресия на гена за NRF2, TNF-α, IGTAM в синовиални екстракти, определена чрез RT-PCR (a) и на протеините Nrf2, TNF-α, IFN-γ в неутрофили от кръв, определена чрез проточна цитометрия. Данните показват средноаритметична стойност ± SEM от два независими експеримента с 4 мишки/група. *p<0.05 при сравнение между CAIA и PBS групите, # p<0.05 при сравнение на групите с контролата при PBS групите, ANOVA тест.

Нивото на TNF- α в синовиалната тъкан е критично за възпалителния процес и деструкция в ставата. Установено бе, че при САІА мишките транскрипцията на цитокина бе значително понижена спрямо контролната група без артрит (Фигура 13а). Предложени са две хипотези. Първата, че при артритните мишки има нарушена авто-регулация на транскрипцията, поради дисбаланс между вътреклетъчното ниво на цитокина, постигнато чрез интензивен синтез на цитокина в цитоплазмата и апарата на Голджи, и от друга страна, дегранулацията и секрецията на цитокина, заради сигнали от възпалителната среда.

Другата хипотеза за понижената продукция, се базира на нарушено стабилизиране на иРНК или намален полуживот на иРНК за цитокина при синовиалните клетки, предизвикано от възпалението в ставата. Фракцията и веществата не засягат значимо експресията на TNF- α гена в синовиалните екстракти. Обяснение на резултатите може да бъде и факта, че екстрактите съдържат разнообразни клетъчни типове, които имат различно ниво на експресия на цитокина.

При циркулиращите неутрофили, имаха намален процент на TNF- α + клетки, което може да се дължи или на миграцията им в мястото на възпаление или на секрецията на цитокина в кръвта (Фигура 13b). Фракция D потисна процента на TNF- α + клетки, както при здрави, така и при мишки с САІА. Докато миконозид индуцира нарастване на клетките, продуциращи цитокина в кръвта при здрави мишки, в групата на САІА животните той редуцира броя им (Фигура 13b). Калцеолариозид Е не промени процента на TNF- α + неутрофили (Фигура 13b). Чистите вещества повишават значимо експресията на гена за CD11b (Фигура 13a), което е в съответствие с други данни в дисертацията, че експресията на CD11b се засяга от активиране на Nrf2 г е свързана с повишена чувствителност към стареене. Циркулиращите неутрофили в кръвта от контролните животни имаха повишено вътреклетъчно ниво на IFN- γ при третиране с миконозид и с калцеолариозид Е (Фигура 13b). Чистите вещества намалиха нивото на цитокина в САІА неутрофилите, но този ефект не бе значим и вероятно бе свързан с развитието на артрит, а не със специфично действие на веществата (Фигура 13b).

В заключение нашите резултати показаха, че биологичната значимост от приложението на CDDO-Me, фракция D, миконозид и калцеолариозид Е се дължи на модифициране на експресията на Nrf2 в неутрофили, промяна в миграционната им способност, индуциране на стареещ фенотип и потискане на продукцията на важния за хроничното възпаление про-възпалителен цитокин TNF- α .

V. Дискусия

Транскрипционния фактор Nrf2 играе важна роля в поддържане на клетъчните функции, като поддържа базовото ниво на експресия на повече от 100 гени, свързани с антиоксидантната защита. При стресови сигнали като възпаление, хипоксия, увреждане от ROS или токсини, Nrf2 се активира и повишава транскрипцията на гените, свързани с антиоксидантната защита, детоксикацията и се трансактивират гени, отговорни за възпалението и разнообразни клетъчни ефекторни функции. Един от механизмите, по които Nrf2 може да намали възпалителния отговор, е чрез директно или индиректно регулиране на експресията на гени, които отговарят за синтеза на про- и антивъзпалителни цитокини и медиатори. Вторият механизъм е чрез предоставяне на така наречен „метаболичен комфорт“, като осигури баланс между редокс/антиоксидантни и окислителните механизми, и регулира нивото на катаболитни и метаболитни реакции в клетката, протичащи по време на възпаление. По този начин, в контекста на хронично възпаление, фармакологичната модулация на Nrf2 може да има проотивовъзпалителен ефект и съответно терапевтичен потенциал при заболявания, свързани с персистиращо възпаление и дегенеративни процеси. Освен това, Nrf2 може да играе роля в процесите на стареене, анергия, апоптоза, фероптоза и други механизми, свързани с клетъчна смърт и регенерация на тъканите. В последните години стана ясна ролята на Nrf2 в патогенезата на невродегенеративните заболявания, като фармакологично активиране на Nrf2 се свързва със забавяне на прогресията на Алцхаймер и Паркинсон, в резултат от контрол над стрес-индуцирани процеси в нервните клетки и регенерация на невроните (Baird and Dinkova-Kostova, 2011). Редица проучвания сочат, че приложението на Nrf2 активатори, като CDDO-Me, потиска прогресията на дегенеративното ставно заболяване – остеоартрит (Marchev et al 2017). Основните механизми, свързани с терапевтичното действие на CDDO-Me се дължат на 1) ефект върху хондроцитите, потискане на хипертрофирал фенотип на хондроцитите, индукцията на фероптоза и апоптоза при активирани хондроцити, 2) потискане на остеокластогенезата и активирането на остеокластите и 3) регулиране на катаболитния метаболизъм в остеобластите чрез контрол над редокс-клетъчните системи. Въпреки, че ролята на Nrf2 върху локалните процеси на увреждане на костта и хрущяла, е изследван, по-малко са доказателствата за ефекта от активиране на Nrf2 върху функцията на неутрофилите, които се отличават с по-висока експресия на Nrf2 от останалите миелоидни клетки. В този аспект настоящата дисертация, предоставя за първи път данни за ефекта от фармакологично модулиране на експресията на Nrf2 в неутрофили при дегенеративни и възпалителни ставни заболявания.

V.1. Растителни екстракти и техни метаболити – източник на потенциални нискомолекулни съединения за модулиране на функцията на неутрофилите и за подбор на метаболити, които да променят експресията и активацията на Nrf2.

Първоначално, при разработване на дисертацията бяха събрани растителни екстракти от диворастящи *H. rhodopensis*, *B. nigra*, *C. vulgare* и *L. cardiaca*. Тъй като *H. rhodopensis* е ендемичен вид и с цел запазване на биологичното му разнообразие, бе използван биотехнологичен подход за *in vitro* култивирането му. Микроразмножаването на *H. rhodopensis* бе разработено като протокол и описано в полезен модел, защитен към Център по Растителна и Системна Биология и Биотехнология, Пловдив. Това позволи да се повиши концентрацията на конкретни метаболити между 12-30 пъти, в сравнение с диворастящия вид. Разработеният полезен модел може да разшири практическото приложение на култивиране на растението както е предложено от Moraes et al., 2021, а именно да се: а) поддържа растението за производство на БАВ, б) да се създадат „фитомедицински“ култури за производство на стандартизирани терапевтични природни продукти.

Разработването на дисертацията следваше алгоритъм с начално прилагане на етнофармакологичния подход, за подбор на подходящи растения за изследване. След това бе

извършен системен анализ на литературата, относно съдържанието на БАВ в растителните екстракти. Използван бе подобен метод на този, който се използва общо за системен обзор на литературата и е добре описан от Schmidt et al. 2021. Началното търсене бе в платформата LOTUS, която е най-голямата до момента свободна база данни за бърза идентификация на природни молекули в растения. Данните за всяко съединение бяха потвърдени с профила на нискомолекулулните съединения в PubChem на NCBI, охарактеризиращ тяхната структура и биологична активност. Разширяването на термините за търсене с нови ключови думи и в други търсачки като PubMed и Google Scholar даде възможност да се рестриктира търсенето, така че да се подберат БАВ в избраните растения, за които няма достатъчни данни относно действието им върху Nrf2, но има данни за противовъзпалително действие. Важно бе да се свърже наличната литература с участието на неутрофилите в различни патологични състояния и да се определи подходяща таргетна популация. Подбрани бяха 10 съединения с потенциал върху Nrf2 и/или неутрофили на базата на данните от литературната справка – 3 от тях са фенолетаноидни гликозиди (миконозид, розмаринова киселина, форситозид В), 3 – дитерпени (балотетрозид, балонигрин, балотинол) и 2 – алкалоиди (леунорин и стахидрин). Тези първоначални литературни данни ни ориентираха за евентуалните дози и концентрации на приложение на растителните екстракти *in vivo* и *in vitro*, съответно.

За да се потвърдят или отхвърлят литературните данни за наличието на конкретни нискомолекулулни съединения, се извърши 1H-ЯМР анализ и той бе съчетан с 13C-ЯМР и HSQC профилиране. Първият анализиран от нас екстракт бе метанолен екстракт на *C. vulgare* (CVE). Метаболитният „отпечатък“ показва наличие на фенолни киселини, като бяха идентифицирани структурите на розмаринова киселина, катехин, кафеена и хлорогенова киселина. Наблюдаваните HSQC спектри бяха идентични с докладвани данни от други изследователи (Gao et al., 2021; Wang et al., 2013; Znati et al., 2014; Zhao et al., 2021). Чрез използване на HPLC анализ се установи, че количеството на хлорогенова киселина, кафеева киселина и катехин бе високо и представлява особена характеристика на CVE екстракта. Повечето фенолни киселини, се считат за потенциални противовъзпалителни агенти от растителен произход (Burk et al., 2009; Kulabas et al., 2018; Lee et al., 2022), което ни накара да изследваме ефекта на растителния екстракт и чистите вещества върху функцията на неутрофилите.

При проследяване на апоптозата в неутрофили, се установи, че CVE не предизвика промени в степента на апоптоза при концентрации до 1000 ng/mL. Въпреки това, при пре-активирани неутрофили *in vivo*, но култивирани след това *in vitro* в присъствие на CVE, се повиши процента на апоптичните клетки. Предполагаме, че в CVE се съдържат метаболити, които действат синергично върху про- или анти-апоптични пътища, нарушавайки баланса между тях, особено в пре-активираните клетки. Различното ниво на клетъчна активация със съответните сигнални пътища, може да дефинират повишена чувствителност на неутрофилите към апоптоза, индуцирана от нискомолекулулни съединения (Dimitrova et al., 2019). Про-апоптичните ефекти на CVE вероятно са подобни на тези на екстракта от *C. chinense* (Li et al., 2018; Zhu et al., 2014). Доказано е, че екстрактът потиска спонтанната апоптоза през анти-апоптичния протеин Bcl-2 (Li et al., 2018), което супресира про-апоптичните Bax и Bak протеини (Leininger et al., 2006). Друг механизъм, може да включва инхибиране на p65 субединицата на NF-kB, което намалява експресията на гени, регулиращи активирането на каспази-3 и -9 (Fox et al., 2010; Zhu et al., 2014) или свързани с протеина DAPK2, ключов индуктор на апоптоза, по време на развитието и зрееенето на неутрофили (Britschgi et al., 2008), или потиснати механизми, свързани с митохондриална дисфункция (Watanabe et al., 2004). Въпреки това, точните механизми, задействани от CVE върху про или анти-апоптоични пътища при възпалителни състояния, и съответно, при пре-активирани клетки може да се различават от тези при наивни неутрофили. Концентрация на CVE и чистите вещества до 1000 ng/mL не предизвика апоптоза, но инхибираше експресията на

индуцираната в пре-активирани неутрофили COX-2. Кафеената и хлорогенова киселини показва подобни ефекти и поради високо им съдържание в екстракта, се предполага, че те определят и активността на CVE върху COX-2. Кафеената киселина се счита за активен метаболит, и нейните производни се използват в технологията за разработване на нови хибридни молекули, инхибиращи експресията на COX-2 (Kulabas et al., 2018). Биологичният ефект на кафеената киселина се свързва с потискане на транслацията и стабилността на COX-2 и p38 MAPK (Michaluart et al., 1999), NF- κ B сигналния път (Cheng et al., 2018) или активиране на HO-1 (Choi et al., 2018). Способността на веществото да инхибира функцията на клетките обаче, е силно зависима от използваната концентрация, като ефектите и са най-добре изразени при концентрация от 1000 ng/mL. Хлорогеновата киселина инхибира също индуцираната COX-2. Подобни данни са наблюдавани при LPS-активирани RAW 264.7 макрофаги, където метаболитът потиска експресията на COX-2 и p38 MAPK и активността на ензима (Guan et al., 2014). Един спекулативен механизъм, свързан с действието на хлорогенова киселина включва модулиране на липидната пероксидация, зависима от ензима миелопероксидаза (Zhang et al., 2022) и p38 MAPK сигналния път (Uchida, 2017). В експериментален модел на остеоартрит при плъхове и при човешки хондроцити, хлорогеновата киселина инхибира NF- κ B зависимата експресия на COX-2 и продукцията на простагландини (Liu et al., 2017). В неутрофилите, хлорогеновата киселина прекъсва сигналите през адапторен протеин MyD88 в неутрофили в модел на LPS-индуциран шок (Park et al., 2015). Въпреки че, CVE намалява експресията на COX-2, катехин има противоположна активност върху нивата на COX-2 и честотата на LPS+COX-2+ клетки. Този резултат изглежда не е изненадващ, тъй като синтетичният катехин инхибира активността на COX-1 и се комбинира с COX-2 инхибитори при терапия на рак на пикочния мехур (Mohseni et al., 2004) и рак на гърдата (McFadden et al., 2006). За разлика от синтетичните форми, катехините от растителни екстракти не проявяват странични ефекти, свързани с повишен риск от стомашно кървене (Kemberling et al., 2003) и често ефектът им върху активността на циклооксигеназата се маскира от наличието на рутин (Gabr et al., 2018), байкалин и β кариофилен (Yamaguchi and Levy, 2016) или от допълнителни ефекти върху синтеза и секрецията на цитокини и миграцията на неутрофили, както и от инхибиране на стабилността на Nrf2 в неутрофили (Marinovic et al., 2015).

Обобщените данни показват, че CVE, кафеената и хлорогеновата киселина ефективно инхибират индуцираната от зимозан COX-2 експресия в пре-активирани неутрофили, докато катехин повишава вътреклетъчното ниво на COX-2. Предполагаме, че кафеоилната част в структурата на двете фенолните киселини има значение за проявените антивъзпалителни ефекти. Получените данни показват, че CVE може да има добър потенциал за манипулиране на функциите на неутрофилите, но действието му зависи от състоянието на клетките, възпалителната среда и относителното съдържание на кафеена и хлорогенова киселина. Противовъзпалителната активност на CVE, показва, че *C. vulgare* може да е потенциален източник на метаболити с противовъзпалителна активност при активирани неутрофили.

В растителния екстракт от *L. cardiaca*, при HSQC профилиране бе потвърдено наличието на леонурин и стахидрин, а в растението *B. nigra* чрез ЯМР анализ са идентифицирани, вербаскозид и балонигрин, подобно на други изследвания (Vrchovska et al., 2007). Вербаскозид е фенилпропаноид съдържащ две ди-орто-фенолни структури: α -рамноза-11-3- β -d-глюкозид от хидрокси-тирозин и кафеена киселина, а балонигрин е лабданов дитерпен, който съдържа лабдан- ди-циклична корова структура и биохимичния му синтез включва активиране на ензимите дитерпен синтаза и цитохром P450. В предишни изследвания в Лабораторията по метаболомика, са систематизирани данните относно антиоксидантните, антивъзпалителните и антитуморните ефекти на вербаскозид и форситозид от лопен (*Verbascum sinuatum* L.). Демонстриран е ефектът на вербаскозид върху функцията на неутрофилите (Alipieva et al., 2014, Dimitrova et al., 2019), като силата и селективността на веществата зависят от степента на активиране и функционално състояние на клетките.

В метаболомният отпечатък на растителните екстракти от *H. rhodopensis* са идентифицирани специфичните фенилетаноидни гликозиди, миконозид и поуцифлорозид, както и няколко флавонови 8-С-гликозиди, като съединението миконозид бе в голямо количество в растението, подобно на данни от други изследователи (Georgiev et al., 2012; Marchev et al., 2021). Миконозид се състои от 3,4-ди-хидрокси-фенилова част, прикрепена към скелет на глюкоза с две β -апиозилови части и ди-хидро-кафеоилна структура, свързана с глюкозата (Jensen, 1996, Timoteo et al., 2015). Миконозидът е разпространен в няколко растителни вида Gesneriaceae, включително *H. rhodopensis*, *Ramonda serbica* (L.) Rchb., и *R. serbica* Panc. В настоящата дисертация, се извърши фракциониране на екстракта и се определиха няколко фракции – фракция В, съдържаща предимно миконозид, фракция D и E, които съдържат миконозид и калцеолариозид E в различно съотношение - 1: 0.6 и 0.25: 1, съответно. От фракция E бе изолиран калцеолариозид E. Това съединение също е фенилпропаноиден гликозид, изолиран за първи път от листа на *Lantana camara* и се идентифицира като метаболит в в няколко семейства растения, например семейството *Episcieae*, като съдържанието на калцеоларозид E в *Lippia* spp., достига до 0.08 mg/g сухо тегло (Timoteo et al., 2015). Калцеолариозид E също има 3,4-ди-хидрокси-фенилетил структура, прикрепена към скелета на глюкоза с една β -апиозилна структура и дихидрокафеилова част, свързана с глюкозата. Установено е, че съдържанието на миконозид и калцеоларозид E в диворастящия вид се увеличава повече от 12 и 30 пъти, съответно при *in vitro* култивирани растения, както съотношението между миконозид и калцеоларозид E е 1:0.3 в диворастящия вид, и 1:0.7 в култивираните растения. При микроразмножаване, съдържанието на миконозид може да варира от 9 до 33%, като наличността му в растенията може да се увеличи допълнително чрез генетична манипулация и/или при промени във факторите на околната среда (състав на хранителната среда, температура, светлина и т.н.) по време на *in vitro* култивирането на *H. rhodopensis*. В последната фракция са установени две структури хиспидулин 8-С- (2-О-сирингоил- β -глюкопиранозид) и хиспидулин 8-С- (6-О-ацетил-2-О-сирингоил- β -глюкопиранозид), които се потвърдиха с ЯМР и съответстваха на спектрите от данни на други изследователи (Nicoletti, M wt al., 1988; Caniguel et al., 1996; Jensen et al., 1996; Damtoft et al. 2013; Timoteo et al., 2015). Литературните данни показват, че подобрите екстракти съдържат метаболити, които могат да повлияват функцията на неутрофилите и за тях има литературни данни, че модифицират активността или експресията на Nrf2. В проведените експерименти при диференцирани гранулоцити, се установи, че нивото на експресия на NRF2 гена (при човек означен с NFE2L2) гена се променя под действие на растителните екстракти и чистите вещества: експресията на гена се повишава от миконозид спрямо растителния екстракт от *H. rhodopensis*; от форситозид, вербаскозид и балонигрин спрямо растителен екстракт от *B. nigra* и се понижи от леонури и стахидрин в сравнение с екстракт от *L. cardiaca* и от розмаринова киселина в сравнение с екстракт от *C. vulgare*. Клетките са третирани за 4 часа, като последващия анализ показва, че процентът на Nrf2+ клетки, на 18-ти час, когато експресията на NFE2L2 се стабилизира, е повишен при третиране с *H. rhodopensis* и *L. cardiaca* и почти непроменен при третиране с *C. vulgare* и *B. nigra* при сравнение с контролите. Екстрактите на *H. rhodopensis* съдържат различни по структура съединения, фенилетаноидни гликозиди (миконозид, калцеолариозид E) от тези на *L. cardiaca*, където идентифицираме дитерпени (балотетрозид, балонигрин, балотинол), съответно. Силните фармакологичните Nrf2 активатори са обикновено електрофилни молекули, които повлияват цистеиновите остатъци на Keap1 (Robledinos-Antón et al., 2016;2019), като нивото и броя на променените остатъци, контролира активността на Keap1, според необходимостта от активиране на Nrf2 (Wakabayashi et al., 2004). Силният активатор на Nrf2, CDDO-Me е тритерпен и с подобна корова структура на дитерпените в *L. cardiaca*. Тритерпеноидите се синтезират в растенията чрез циклизация на сквален, верижен тритерпенов въглеводород и предшественик на всички стероиди, като има опити за получаване на полусинтетични олеанови тритерпеноиди с

подобрана бионаличност и с противоракова активност. Във високи концентрации тритерпеноидите потискат растежа и пролиферацията на различни тумори, а в ниски концентрации те проявяват цитопротективна и противовъзпалителна активност. Предполагаме, че дитерпените в *L. cardiaca* могат да предизвикат директно електрофилно взаимодействие, с действие предимно върху активността на Nrf2, но не задължително върху експресията на транскрипционния фактор, като на 18ия час след третиране, установяваме значително повишен процент на Nrf2+ клетки. От друга страна миконозид и калцеолариозид Е имат структура на фенилетаноидни гликозиди, които могат да модифицират експресията на Nrf2 и съответно Nrf2/OH-1 сигналният път (Wu et al., 2020), както и вероятно да повлияват други сигнални пътища през PI3K и NF- κ B. Подобно на нашите изследванията, други автори показват, че фенилетаноидни гликозиди, като салидрозид, вербаскозид, изовербаскозид и ехинакозид, стимулират експресията на Nrf2 в концентрации между 0.1–10 μ g/mL и повлияват H₂O₂-индуцирана апоптоза (Badenetti et al., 2023). Установено е също, че форситозид А повишава експресията на Nrf2 и OH-1 в първични и BV2 микроглиални клетки, стимулирани с LPS, както и *in vivo* в модел на чернодробно увреждане. Предполага се, че броят на глюкозните единици във фенилетаноидните гликозиди може да корелира със степента на активиране на Nrf2/OH-1/ARE пътя (Badenetti et al., 2023).

Данните за биоактивност разкриха, че когато се използват самостоятелно в същата концентрация (32 μ g/mL), фенилетаноидните гликозиди, миконозид и калцеолариозид Е индуцират различни реакции в неутрофилите, както върху клетъчната жизнеспособност, така и върху експресията на Nrf2. Миконозид притежава допълнителна β -апиозилова част в С-6 позиция на глюкозния пръстен в сравнение с калцеолариозид Е. Освен това, калцеолариозид Е в С-4 позиция е свързан с дихидро-кафеоиловата структура, докато миконозидът притежава кафеоилова част. Съответно би могло да се спекулира, че допълнителната двойна връзка в молекулата на калцеолариозид Е, така и допълнителният апиозилов пръстен в миконозида са важни за индуцираните биологични им ефекти. По същия начин, двата фенилетаноида вербаскозид и изовербаскозид модулират възпалението по различни пътища и в различна степен (Dimitrova et al., 2019). Промяната в структурата също може да е причина за различна селективност на двете вещества по отношение на специфичен сигнален път включително и на този през Nrf2/OH-1 и за Keap1-независима регулация на Nrf2, както и да е причина за различен механизъм за регулация на стабилността на транскриптите и/или транслокацията на Nrf2 в ядрото. Например, нашите данни показва, че калцеолариозид Е предизвиква РМА индуцирана експресия на NFE2L2 гена, като повиши и протеиновото ниво на Nrf2, но не промени значимо нивото на PI3K. Миконозид показва противоположно действие, подобно на това на CDDO-Me, като намали транскриптите за Nrf2 в РМА-стимулирани клетки, но поддържаше нивото на Nrf2 протеина и повиши експресията на PI3K. PI3K сигналният път може да задвижи индиректно Keap1-независимата стимулация на активността на Nrf2 чрез потискане на фосфорилирането на киназа GSK-3, което да компрометира разпознаването на Nrf2 от β -TrCP и последващата убиквитинизация на Nrf2 (Kaidanovich-Beilin 2011). Самият PI3K сигнален път може да регулира Nrf2-зависимата експресия на HO-1, TRX и PRX1. В съответствие, бе установено, че миконозид повлиява позитивно РМА-индуцираната експресия на PRX1 и SOD-1, докато калцеолариозид Е имаше обратен ефект. Възможно е повишеното ниво на PI3K киназата от миконозид да подпомага активирането на други транскрипционни фактори например Akt, които да се свържат с ARE последователностите и да доведат до стабилизиране на експресията на Nrf2. Всъщност е доказано, че инхибитори на PI3K киназната активност, дезактивират Nrf2 (Nakaso et al., 2003; Wang et al., 2008). Не може да се отхвърли и хипотезата миконозид да предизвиква активиране на сигнали, които да водят до Nrf2-медирана трансактивация, силата на която да се променя спрямо нивото на Nrf2 и участието на sMaf (Wu et al., 2011).

Друг механизъм, който може да обясни разликата между ефектите на калцеолариозид

Е и миконозид може да е специфичен ефект върху механизмите, които стабилизират иРНК транскриптите и/или транслокацията на Nrf2 в ядрото. Възможно, е ефектите им да се медираат от действие върху различни miРНКи. Например miR-28, miR-27a, miR142-5p, и miR-144 могат да контролират нивото на Nrf2 транскриптите (Tonelli et al., 2018) или да се стабилизират различни изоформи на протеина, например такива, при които има модификации в Keap1-свързващия домен, което да стабилизира Nrf2 (Goldstein et al, 2016). Не можем да отхвърлим и някое от веществата да действа върху Keap1 и формиране на комплекса Keap1-Nrf2, а не конкретно върху Nrf2, например чрез засягане на конкурентното убиквитиниране през p62, което е характерно за процеса на автофагия и фероптоза (Tonelli et al., 2018). Допълнително доказателство за тяхното различно действие върху Nrf2 е, че дори и при различно съотношение, в отделните фракции D и E, двете съединения действат синергично и индуцират Nrf2 експресия в по-голям брой неутрофили. Данните ни показват, че фракция D, където присъстват двете вещества, повиши експресията на NFE2L2 гена, както в нестимулирани, така и в PMA-стимулирани клетки, което подкрепя хипотезата, че метаболитите действат синергично, дори и при липса на стимул за активиране на клетките. Необходими се по-задълбочени изследвания относно действието на двете вещества върху Nrf2 и/или Keap1-Nrf2 взаимодействията.

V.2. Модифициране на Nrf2 в неутрофили – терапевтичен потенциал

Данните показваха, че както CDDO-Me, така и миконозид повишават броя на Nrf2+ клетки. Тези клетки може да са по-малко чувствителни към стареене, и поддържането им вероятно е причинено от активиране на сигнални пътища, които при по-продължителна стимулация предотвратяват механизмите за стареене и/или апоптоза. Възможно е, тези ефекти да са независими от директното повлияване на експресията на Nrf2 и да се стартират паралелно, и/или индиректно. Един от основните ни въпроси, бе каква е биологичната значимост от модифициране на Nrf2 в неутрофили?. Затова бяха извършени поредица от опити, с CDDO-Me, който е доказан електрофил-активатор на Nrf2. Литературните данни показват, че CDDO-Me стабилизира транскриптите за Nrf2 и влияе не само върху Keap1/Nrf2/ARE, но и върху NF-κB и STAT3 сигналните пътища (Badenetti et al., 2023). Установено бе че, CDDO-Me повлиява чувствителността на неутрофилите към стареене – senescence, като повишава нивата на Nrf2 в неутрофилите и понижава експресията на CXCR4 *in vivo* и *in vitro*. При стареене неутрофилите експресират маркера за стареене CXCR4, като от циркулацията се връщат в костния мозък, умират и се елиминират от макрофагите, за да се стимулира гранулопоезата. Този сложен механизъм за регулация на гранулопоезата всъщност е нарушен при различни патологични състояния и често е резултат от промяна в процесите на апоптоза и стареене при неутрофилите. В настоящата дисертация за първи път е направено проучване за влиянието на Nrf2 при неутрофили, като е изследвана връзката между senescence и CXCR4. Установено е, че, активаторът на Nrf2 CDDO-Me понижава експресията на CXCR4 върху повърхността на неутрофилите, получени от кръв и ВМ, след стимулиране с LPS *in vitro* и по време на прогресиране на патологията на ставното увреждане. Наблюдава се, че CDDO-Me повишава нивата на Nrf2 и фосфорилирането на p38, а също така увеличава преживяемостта на неутрофилите, вероятно чрез потискане на зависимото от каспази срязване на PARP-1. CDDO-Me намалява по дозозависим начин експресията на CXCR4, както при LPS-стимулираните, така и при нестимулираните клетки. Действието му се наблюдава главно върху почувствителните CD11b+, за разлика от CD11b- клетки. Всъщност се установи намаляване на честотата на LybG+CD11b+CXCR4+, които експесират и втори маркер за senescence галактозидаза (Gal+) с около 1.8 пъти. *In vivo* прогресирането на увреждането на колянната става, предизвикано от инжектиране на колагеназа, води до повишена експресия на CXCR4 върху неутрофили в циркулацията и костния мозък, като се демонстрира корелационна зависимост между прогресията на заболяването и повишеното стареене на неутрофилите.

Активаторът на Nrf2 при мишките с остеоартрит повишава нивото на Nrf2 в ВМ неутрофили, като повишава честотата на зрелите Ly6G+/CD11bhi клетки на 7-ия и 14-ия ден след индуциране на заболяването, но редуцира експресията на CXCR4 върху ВМ неутрофили със застаряващ фенотип. Тези резултати са забелязани паралелно с подобрените хистологични промени при колагеназа-индуцираното увреждане на хрущяла, с инхибиране на ключовите фактори, като TNF- α и MMP-9 в синовиалните екстракти.

Повърхностната експресия на CXCR4 в неутрофилите може да се регулира от Nrf2. При раковите заболявания, експресията на CXCR4 и Nrf2, е свързана с метастази и лоша прогноза. Nrf2 се свързва с ARE- елементи в регулаторните области на различни гени, които могат да бъдат косвено или пряко включени в сигнализирането и експресията на CXCR4 в неутрофилите чрез контрол над редокс баланса, които подпомага оста SDF-1/CXCR4. Nrf2 може косвено да контролира експресията и интернализацията на хемокиновия рецептор чрез контрол върху гените за оксидативен стрес. В мезенхимни стволови клетки делетиране на CXCR4 увеличава ROS и активира p38, като намалява клетъчния регенеративен потенциал. Различните клетъчни типове експресират в различна степен Nrf2 за осъществяване на специфичните си функции. В клетките с активна транскрипция, Nrf2 може да се свърже директно с CXCR4-зависимия генен промотор/енхансер, както е демонстрирано за Nrf1 и CXCR4-зависимите промотори в ретината на плъх или в мезенхимните стволови клетки (Tsai et al, 2013, Chen et al., 2017). Неутрофилите обаче са краткоживеещи клетки с ограничена транскрипционна активност *de novo* и CDDO-Me може да повлияе експресията/интернализацията на CXCR4 чрез пряко взаимодействие с други вътреклетъчни протеини, включително Notch, I κ B киназа, NF κ B, Akt, TGF- β и STAT3. Тъй като CDDO-Me инхибира експресията на CXCR4 по дозозависим начин, е възможно това съединение да потиска миграцията на неутрофилите към хемотаксисния лиганд SDF-1. Предполагаме, че CDDO-Me регулира миграцията на неутрофилите, като задейства компенсаторен механизъм за ре-експресия на хемокинови рецептори и/или производство на хемокини, което може да е свързано със загуба на контрол върху сигнализирането след CXCR4, промяна на стабилността на CXCR4 иРНК или модулация чрез специфични miРНКи. Един от потенциалните регулатори на миграцията на неутрофилите включва антиоксидантния ензим HO-1, който се регулира от CDDO-Me. Установено е, че HO-1 регулира освобождаването на хемокини, миграцията на неутрофили в тъканите и съответно предпазва увреждането на тъканите при възпаление. Механизмът включва експресия на HO-1 през p38 MAPK сигнален път (Pae and Chung 2009). Наблюдава се, че CDDO-Me увеличава фосфорилирането на p38 по дозозависим начин, както и повишава цитоплазменото ниво на Nrf2 след LPS стимулиране. Самият SDF-1 може да индуцира HO-1 и да активира рецепторната сигнализация, спонтанно и независимо от HO-1-зависимата експресия на CXCR4 (Deshane et al., 2017). *In vivo* ефектът на Nrf2 върху миграцията на неутрофилите може да бъде повлиян от допълнителни механизми, включващи протеина HBMG1, който регулира зависим от рецептора за RAGE трафик на възпалителни клетки в синовиалната течност при ОА или CXCR4 сигнализирането, миграцията и пролиферацията на хондроцитни прогенитори, поглъщащи пула на хондроцити при късния стадий на ОА (Kwak et al., 2020).

Клетъчното стареене е сложен процес на спиране на растежа, който не е придружен от клетъчна смърт. Той започва с повишаване на чувствителността на клетките към стареене в подготвителен процес наречен senescence и е пример за еволюционна антагонистична плейотропия. Фенотипа за senescence, наречен SASP, се свързва с нефункциониращи теломери, увреждане на ДНК, промени в тумор-супресорните пътища, под контрола на p53, и промени в организацията на хроматина (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Фенотипът SASP обикновено се описва при пролифериращи клетки (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). За разлика от тях неутрофилите са краткоживеещи диференцирани клетки с ограничена транскрипционна активност и пролиферация и с малък капацитет за поправка на ДНК.

Увеличената чувствителност към стареене на неутрофилите е част от регулаторните механизми за поддържане на маргиналните пулове от неутрофили в кръвта, костния мозък и в други органи. *In vitro* застаряващите зрели неутрофили показват промени в миграцията, дегранулацията и възпалението чрез промени в експресията на miRNKi, които контролират хемокиновата и цитокиновата сигнализация, активността на малките GTPase и актиновия цитоскелет (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Клетъчното стареене може да окаже влияние върху развитието на хронични възпалителни заболявания.

Модулирането на Nrf2 влияе върху стареещи неутрофилите при ставните патологии. Неутрофилите могат да участват в патологията на остеоартрит или ревматоиден артрит, поради хроничното възпаление. Част от факторите, които го поддържат се медиират от сигнали през вродените рецептори за опасност – като RAGE и секреция на лиганда за тези рецептори HMGB1, от увредени хондроцити и активирани остеокласти. HMGB1 може да доведе до пироптозата в макрофагите и синовиалните фибробласти, като ускори срязването на неактивните форми на IL-1 β , IL-18 и гасдемин D (Volchuk et al, 2020). В последните години се доказва, че Nrf2 активно участва в този механизъм на сигнализиране, като регулира секрецията на HMGB1 и затова намалена експресия на този протеин предпазва от артрит (Wagner et al., 2021). Изследванията върху Nrf2 и HMGB1 показват, че фармакологичното активиране на Nrf2 предизвиква освобождаване на HMGB1, което е зависимо от инфламазомата и се случва в резултат от свръхекспресията на RAGE (Wagner et al., 2021). Според публикуваните данни и в противоречие с наблюдаваното от нас, вътреставното инжектиране на CDDO-Me може да стимулира секрецията на HMGB1, следователно влошавайки СЮА. Предполага се, че това несъответствие е свързано с факта, че в ранните етапи на развитието на остеоартрита, пироптозата би била по-малко видима, отколкото в късните етапи на ОА, и че различните клетъчни типове, участващи в тази сложна патология, биха реагирали по различен начин към активирането на Nrf2, за индуциране на пироптоза. Например неутрофилите са ранен участник в деструктивния процес при колагеназа-индуциран остеоартрит и интензивно инфилтрират синовиалната течност в първия ден от индуциране на нестабилност в ставата с колагеназа, докато моноцитите мигрират на третия ден (Benigni et al., 2017). В късните етапи на болестта обаче, ролята на макрофагите и неутрофилите може да се променя в зависимост от силата на персистиращо възпаление и увреждане на хрущяла. В късните етапи на ОА възпалението се поддържа от секрецията на IL-1 β чрез HMGB1-медиирания инфламазомен път и на този етап, повишената експресия на Nrf2 в макрофагите потиска пироптозата, която се индуцира от гасдемин D (Karmakar et al. 2020). При неутрофилите обаче липсва гасдемин-медирана пироптоза и затова те могат да освобождават IL-1 β в тъканите. Така, те влошават всъщност късните стадии на ОА, като осигурят допълнителен източник на IL-1 β и въпреки че, присъстват в малък брой в синовиалната течност при ОА, могат да активират хондроцитите. Следователно чрез намаляване на стареенето на неутрофилите с CDDO-Me може да се ограничи възможността за повишаване на IL-1 β по неканоничен и нелитичен път в синовиалната течност в късния стадий на ОА, едновременно с инхибиращ ефект върху макрофаги и/или синовиални фибробласти и хондроцити, което да повлияе драматично нивата на ROS и крайния продукт на липидната пероксидация, MDA в хондроцитите и синовиалната течност. Затова се счита, че нивата на MDA и IL-1 β могат да бъдат важни биомаркери за проследяване на локалните ефекти от приложение на Nrf2 активатори в клинични изпитвания за в бъдеще (Xiao et al., 2021).

След като се установи, че локалното приложение на CDDO-Me може да модифицира стареещия фенотип на неутрофилите, бе решено да се приложи фракция D и съответно миконозид и калцеолариозид E при модел на ревматоиден артрит. Един от основните аргументи бе да се индуцира ставно възпаление, но с еднаква сила и при всички животни, без значение от пола и възрастта на мишките, фактори които са важни при модела на СЮА.

Третирането с CDDO-Ме или фракция D, намалява възпалението в два наблюдавани региони между дистална/тарзална кост и тарзална/метатарзална кост. От същите животни са изолирани костно-мозъчни неутрофили и са изследвани чрез флоуцитометрия и Western блот за експресия на протеина Nrf2. При групата CAIA, процентът на LybG+ CD11b+Nrf2+ е почти 3 пъти по-нисък от този в контролната група и третирането с CDDO-Ме предизвиква дозозависимо намаление на клетките, които експресират Nrf2. Това е изненадващ факт, но се предполага, че броят на неутрофилите, експресиращи Nrf2 в кръвта е намален, поради мигриране на тези клетки в мястото на възпаление в ставите. При CAIA, ниската доза CDDO-Ме и фракция D повишават процента на LybG+CD11b+Nrf2+ неутрофили, вероятно стабилизирайки и двата процеса, на мобилизиране на клетките от костния мозък чрез остта CXCR4/SDF-2 и на миграцията на неутрофилите чрез остта CXCR2/IL-8. Всъщност резултатите от денситометричния анализ на имуноблота за Nrf2 потвърждават, че фракция D има потенциал за повишаване на вътреклетъчното ниво на Nrf2 и броя на Nrf2+ клетки в популацията от костно-мозъчни неутрофили при CAIA мишки, като вероятно регулира стареенето и мобилизацията на зрели неутрофили в циркулацията.

Данните показват, че при интраперитонеално третиране на мишките с фракция D, миконозид и калцеолариозид E от 100 µg/мишка подуването на задните лапите, което е увеличено на ден 5-7 в мишките със CAIA, намалява. Установено е, че фракция D, повишава нивото на Nrf2, както в синовиални екстракти от здрави, така и от CAIA мишки, и също в циркулиращи неутрофили. Докато миконозид, калцеолариозид E и CDDO-Ме намаляват експресията на гена в синовиални екстракти, третирането води до повишен брой Nrf2+ клетки в кръвта. Това показва, че ефектът на веществата е локален и зависи от степента на възпаление и увреждане засегнатата тъкан. При CAIA мишките експресия на гена за про-възпалителния TNF-α е значително понижена спрямо контролната група без артрит, вероятно поради интензивния синтез на цитокина и последваща дегранулация или секреция, както и поради нарушено стабилизиране на иРНК или полуживот на цитокина, поради възпалителни сигнали. Установи се обаче, че фракцията и веществата не засягат значимо експресията на гена в синовиалните екстракти, вероятно поради клетъчната хетерогенност. За разлика от синовиума, циркулиращите неутрофили, експресиращи TNF-α+ клетки са понижени при третиране с фракция D и нарастват при CAIA мишки. Фракция D потиска процента на TNF-α клетки, както при здрави, така и при мишки с CAIA, докато миконозид индуцира увеличение на броя на клетките, продуциращи цитокина в кръвта при здрави мишки, въпреки че при артритните редуцира броя им. Предполагаме, че това се дължи на ефекта на миконозид върху стабилизиране на Nrf2 експресията чрез ангажиране на други сигнални пътища, които да регулират силата на сигналите и съответно продукцията на цитокини, например NF-κB. Установено бе, че миконозид увеличава нивото на NF-κB при здрави костно-мозъчни неутрофили в сравнение с екстракта, който го потиска. Отново калцеолариозид E показва различно действие от миконозид, като увеличи нивото на NF-κB, но не промени процента на TNF-α неутрофили и потвърди данните ни при човешки гранулоцити. Предлага се, че активираният Nrf2 или повишената експресия на Nrf2 може да инхибира активацията на NF-κB, като се конкурира за общи ресурси, като кофактори и протеини. Намаленото активиране и последващо фосфорилиране на NF-κB може да предизвика миграция на транскрипционния фактор в ядрото и намаление на експресията му в цитоплазмата. Данните показват повишена експресия на NF-κB, паралелно с повишен Nrf2, от което може да се спекулира, че веществата всъщност потискат активирането на NF-κB чрез поддържане на висока експресия на NF-κB и Nrf2. Вероятно това взаимодействие между Nrf2 и NF-κB може да модулира възпалителните отговори и да осигури баланс между оксидативния стрес и противовъзпалителните механизми в клетките.

Чистите вещества повишават значимо експресията на гена за CD11b, което е в съответствие с нашите данни, че експресията на CD11b е свързана с повишена чувствителност

към стареене. Въпреки, че циркулиращите неутрофили от контролните животни имат повишено вътреклетъчно ниво IFN- γ при третиране с миконозид и калцеолариозид Е, в САІА неутрофилите има потисната продукция на цитокина от нискомолекулните съединения. Предполага се обаче че този ефект е свързан с развитието на артритата, а не със специфично действие на веществата. Въпреки това, данните показват че, модулиране на експресията на Nrf2 при здрави клетки, може да повиши потенциалът към IFN- γ медиранни реакции, свързани с резистентност към инфекция, фагоцитоза на инфектирани клетки и процеси на нетоза. Неслучайно се изследва и терапевтичната значимост на активатора на Nrf2, сулфоран за лечение на COVID-19.

Обобщението на резултатите показва, че биологичната значимост от приложението на CDDO-Me, фракция D, миконозид и калцеолариозид Е може да се свърже с модифициране на експресията на Nrf2 в неутрофили, промяна в миграционната им способност, индуциране на стареещ фенотип и потискане на продукцията на важния за хроничното възпаление про-възпалителен цитокин TNF- α .

VI. Изводи

VII.1. Систематичният преглед на литературата за избор на нискомолекулни съединения от растителни екстракти от *Ballota nigra* L., *Clinopodium vulgare* L., *Leonurus cardiaca* L. и *Haberlea rhodopensis* Friv демонстрира потенциала на 10 молекули за таргетиране на Nrf2 в неутрофили.

VII.2. Метоболомният анализ на проби от растителни екстракти, приготвени от *Ballota nigra* L., *Clinopodium vulgare* L., *Leonurus cardiaca* L. и *Haberlea rhodopensis* Friv демонстрира наличие на вторични метаболити – фенолни киселини (кафеена, хлорогенова, катехин), фенилетаноидни гликозиди (миконозид, калцеолариозид E) и дитерпени (балотетрозид, балонигрин, балотинол).

VII.3. Нивото на миконозид в екстракт на *Haberlea rhodopensis* Friv се повишава при *in vitro* култивирани растения в сравнение с диворастващи.

VII.4. Фракционирането на метанолния екстракти от *H. rhodopensis* води до получаване на фракции с различно съдържание и съотношение на метаболитите миконозид и калцеолариозид E.

VII.5. Неутрофилите са подходяща таргетна популация за изследване на ефекта на екстрактите. Експресията на циклооксигеназа COX-2 се потиска от екстракта на *C. vulgare* и от активните метаболити кафеена и хлорогенова киселина.

VII.6. Човешки гранулоцити и миши неутрофили имат повишена експресията на Nrf2 на транскрипционно и протеиново ниво при третиране с CDDO-Me.

VII.7. Локалното приложение на Nrf2 активатор CDDO-Me има терапевтичен ефект при модел на дегенеративно ставно заболяване, свързано с модулиране на стареещия фенотип на неутрофилите.

VII.8. Фракция D, миконозид и калцеолариозид E повлияват експресията на NRF2 гена и процента на Nrf2 позитивни неутрофили, като механизмът на действие на двете чисти вещества върху Nrf2 е различен и се определя от особеностите на тяхната структурата, селективното им действие върху Nrf2 сигнализирането и върху експресията на PI3K.

VII.9. Приложението на фракция D, миконозид и калцеолариозид E при модел на артрит, индуциран чрез пасивен трансфер на антитела срещу колаген, потиска проявата на клиничните симптоми и хистологичните промени, свързани с инфилтрация на клетки.

VII.10. Терапевтичният ефект на фракция D, миконозид и калцеолариозид E се свързва с модифициране на експресията на Nrf2 и Nrf2 таргетни гени – SOD-1 и PRX1 в синовиални екстракти.

VII.11. Терапевтичният ефект на фракция D, миконозид и калцеолариозид E се свързва с повишен процент на Nrf2+CD11b+ неутрофили и намален брой TNF- α + клетки в циркулацията.

VII. Приноси

Приноси с потвърдителен характер

1. Метоболомният анализ на проби от растителни екстракти, приготвени от *B. nigra.*, *C. vulgare.*, *L. cardiaca* и *H. rhodopensis* потвърди данните от литературата за наличие на вторични метаболити – фенолни киселини (кафеена, хлорогенова, катехин), фенилетаноидни гликозиди (миконозид, калцеолариозид Е) и дитерпени (балотетрозид, балонигрин, балотинол).
2. Локалното приложение на Nrf2 активатор CDDO-Me има терапевтичен ефект при модел на дегенеративно ставно заболяване.
3. Човешките гранулоцити и миши неутрофили имат повишена експресията на Nrf2 на транскрипционно и протеиново ниво при активиране на Nrf2 от CDDO-Me.

Приноси с научно-фундаментален характер

1. За първи път са представени доказателства, че фармакологичното активиране на Nrf2 с CDDO-Me намалява чувствителността към стареене – senescence на миши неутрофили
2. Установено е, че прогресията на остеоартрит е съпроводена с придобиване на стареещ фенотип на неутрофилите.
3. Екстрактът на *C. vulgare* и активните метаболити кафеена и хлорогенова киселина потискат експресията на циклооксигеназа COX-2.
4. Фракция D, миконозид и калцеолариозид Е повлияват експресията на NFE2L2 гена и процента на Nrf2 позитивни неутрофили.
5. Установен е различен механизъм на действие на двете чисти вещества върху Nrf2, който дължи на особеностите на тяхната структурата, селективното им действие върху Nrf2 сигнализирането и експресията на PI3K.
6. Приложението на фракция D, миконозид и калцеолариозид Е подобрява симптомите и патологичните промени в модел на артрит чрез модифициране на експресията на Nrf2 и Nrf2 таргетни гени (SOD-1 и PRX1) в синовиални екстракти и чрез намаляване на броя на TNF- α + неутрофили в циркулацията.

Научно приложни приноси

1. Въведен е полезен модел за култивиране на *Haberlea rhodopensis* Friv *in vitro*, при който нивото на миконозид в екстракт на *Haberlea rhodopensis* Friv неколкократно надвишава това в сравнение с диворастящия вид.
2. Растителният екстракт *Haberlea rhodopensis* Friv може да служи за получаване на фракции с различно съотношение на метаболитите миконозид и калцеолариозид Е.
3. Миконозид и калцеолариозид Е може да се приложат в комбинация за ефективно фармакологично модифициране на Nrf2.

VIII. Публикации и научна активност, свързана с дисертационния труд

Научни публикации

1. Amirova K., Dimitrova P., Leseva M., Koycheva I., Dinkova-Kostova Albena., Georgiev M.I. (2023) The triterpenoid Nrf2 Activator, CDDO-Me, decreases neutrophil senescence in a murine model of joint damage. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10): 8775. (IF₂₀₂₁ 6.208, Q1)
2. Amirova K.M., Dimitrova P.A., Marchev A.S., Krustanova S., Simova S., Alipieva K., Georgiev M.I. (2021) Biotechnologically-produced myconoside and calceolarioside E induce Nrf2-expression in neutrophils. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4): 1759 (IF₂₀₂₁ 6.208, Q1)
2. Marchev A.S., Vasileva L.V., Amirova K.M., Savova M.S., Balcheva-Sivenova Z.P., Georgiev M.I. (2021) Metabolomics and health: from nutritional crops and plant-based pharmaceuticals to profiling of human biofluids. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78 (19-20): 6487-6503 (IF₂₀₂₁ 9.234, Q1)
3. Amirova K.M., Dimitrova P., Marchev A.S., Aneva I.Y., Georgiev M.I. (2019) *Clinopodium vulgare* L. (wild basil) extract and its active constituents modulate cyclooxygenase-2 expression in neutrophils. *Food and Chemical Toxicology*, 124: 1-9 (IF₂₀₂₁ 5.572, Q1)

Забелязват се 25 цитата на научните публикации, включени в дисертационния труд, които са достъпни в база данни с научна информация Скопус с изключени автоцитирания от всички автори/съ-автори (достъп през юни 2023 г.).

Участие в разработване на научни проекти

1. Създаване на Център по растителна системна биология и биотехнология за превръщане на фундаменталните научни изследвания в устойчиви био-базирани технологии в България (739582), 2017-2024.
2. Рационална платформа за устойчива продукция на фармацевтично значими олекули от растения и техните *in vitro* култури, (ДФНИ-В02/14), 2014-2020.

Получени награди

1. Награда "Млад микробиолог 2021" от фондация „Академик Стефан Ангелов“ за публикация - Amirova, K., Dimitrova, P., Marchev, A., Krustanova, S., Simova, S., Alipieva, K., Georgiev, M. (2021) Biotechnologically-produced myconoside and calceolarioside E induce Nrf2 expression in neutrophils. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4): 1759.
2. Награда за „Млад фитохимик на годината“ 2019 г. от Българското фитохимично сдружение с публикация - Amirova K.M., Dimitrova P., Marchev A.S., Aneva I.Y., Georgiev M.I. (2019) *Clinopodium vulgare* L. (wild basil) extract and its active constituents modulate cyclooxygenase-2 expression in neutrophils. *Food and Chemical Toxicology*, 124: 1-9.
3. Награда за „Млад учен“ от International Natural Product Sciences Taskfor (INPST) на 4th Международна конференция за оползотворяване на природни продукти: “От растенията до аптечната лавица” (ICNPU), 29.05.2019 - 01.06.2019, Албена, България.

Участие на научни форуми

1. Amirova, K., Dimitrova, P., Sivenova, B., Koycheva, I., Georgiev, M. Modulation of Nrf2 expression in human neutrophils by *B. nigra* extract. Постерна презентация на 11^{та}

- Международна конференция за медицински и ароматни растения на страните от Южна Европа (СМАРСЕЕС), 06.10.2022-10.10.2022, Ohrid, Macedonia.
2. Amirova, K., Lesseva, M., Marchev, A., Stoyanov, K., Dinkova-Kostova, A., Koycheva, I., Dimitrova, P., Georgiev, M.I. NRF2 – activation by triterpenoids regulate neutrophil senescence in murine model of joint damage. Постерна презентация на 4^{та} Международна конференция за оползотворяване на природни продукти: „От растенията до аптечната лавица“(ICNPU), 29.05.2019 - 01.06.2019, Албена, България.
 3. Amirova, K., Dimitrova, P., Stoyanov, K., Donchev, D., Koycheva, I., Marchev, A.S., Georgiev, M.I. Production of nitric oxide, reactive oxygen species and COX2 by neutrophils under the influence of *Clinopodium vulgare* L. Постерна презентация на 10^{та} Международна конференция за медицински и ароматни растения на страните от Южна Европа (СМАРСЕЕС), 20.05.2018 - 24.05.2018, Сплит, Хърватска.
 4. Amirova, K., Dimitrova, P., Stoyanov, K., Donchev, D., Georgiev, M.I. Effect of *Clinopodium vulgare* L. on the production of nitric oxide, reactive oxygen species and COX2 by neutrophils. Постерна презентация на 3^{та} Международна конференция за оползотворяване на природни продукти „От растенията до аптечната лавица“ (ICNPU), 18.10.2017 - 21.10.2017, Банско, България.
 5. Georgiev, M., Marchev, A., Koycheva, I., Amirova, K., Vasileva, L. Metabolomics, plant biotechnology and lead finding: Perfect holistic match. Презентация на 10^{та} Международна конференция за медицински и ароматни растения на страните от Южна Европа (СМАРСЕЕС), 20.05.2018 - 24.05.2018, Сплит, Хърватска.

IX. Благодарности

Бих искала да благодаря на научните си ръководители - проф. д-р Милен И. Георгиев и доц. д-р Петя А. Димитрова за възможността този дисертационен труд да бъде осъществен.

Изказвам своята благодарност на проф. д-р Албена Динкова-Костова за насоките и експертното мнение в процеса на изготвяне на дисертационният труд.

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

Изказвам своята благодарност и към колегите от лаборатория по Метаболомика и лаборатория по Експериментална имунотерапия към Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ при БАН, както и екипа на Център по Растителна и Системна Биология и Биотехнология, гр. Пловдив за приноса в процеса на изготвяне на този дисертационен труд.

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

Благодаря на семейството и приятелите си, за това че уважават моето развитие във всяко направление и за проявеното търпение през годините.

Х. Библиография

- Alipieva, K., Korkina, L., Orhan, I., Georgiev, M. I. (2014). Verbascoside-A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnology Advances*, 32(6), 1065-1076
- Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20, 200-2016
- Badenetti, L., Manzoli, R., Rubin, M., Cozza, G., Moro, E. (2023). Monitoring Nrf2/ARE Pathway Activity with a New Zebrafish Reporter System. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), 6804
- Baird, L., Dinkova-Kostova, A. T. (2011). The cytoprotective role of the Keap1–Nrf2 pathway. *Archives of Toxicology*, 85(4), 241272
- Benigni, R., Serafimova, R., Parra Morte, J. M., Battistelli, C. L., Bossa, C., Giuliani, A., Fioravanzo, E., Bassan, A., Gatnik, M. F., Rathman, J., Yang, C., Mostrag-Szlichtyng, A., Sacher, O., & Tcheremenskaia, O. (2020). Evaluation of the applicability of existing (Q)SAR models for predicting the genotoxicity of pesticides and similarity analysis related with genotoxicity of pesticides for facilitating of grouping and read across: An EFSA funded project. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 114, 104658.
- Benina, M., Obata, T., Mehterov, N., Ivanov, I., Petrov, V., Toneva, V., Fernie, A. R., Gechev, T. S. (2013). Comparative metabolic profiling of *Haberlea rhodopensis*, *Thellungiella halophylla*, and *Arabidopsis thaliana* exposed to low temperature. *Frontiers in Plant Science*, 4
- Britschgi, A., Trinh, E., Rizzi, M., Jenal, M., Ress, A., Tobler, A., Fey, M., Helin, K., Tschan, M. (2008) DAPK2 is a novel E2F1/KLF6 target gene involved in their proapoptotic function. *Oncogene* 27, 5706–5716
- Burk, D. R., Senechal-Willis, P., Lopez, L. C., Hogue, B. G., Daskalova, S. M. (2009). Suppression of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 murine macrophages by aqueous extract of *Clinopodium vulgare* L. (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 126(3), 397-405
- Caniguel, S., Salvia, M., Villa, R., Iglesias, J. (1996) New polyphenol glycosides from *Ramonda myconi*. *Journal of natural products*, 59, 419–422
- Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(9), 729–740
- Chen, D., Tavana, O., Chu, B., Erber, L., Chen, Y., Baer, R., & Gu, W. (2017). NRF2 Is a Major Target of ARF in p53-Independent Tumor Suppression. *Molecular cell*, 68(1), 224–232.e4
- Cheng, Z., Chu, X., Wang, S., Peng, X., & Li, H. (2018). Six genes of ompA family shuffling for development of polyvalent vaccines against *Vibrio alginolyticus* and *Edwardsiella tarda*. *Fish & Shellfish Immunology*, 75, 308–315
- Choi, E. S., Yoon, J. J., Han, B. H., Jeong, D. H., Lee, Y. J., Kang, D. G., & Lee, H. S. (2018). Ligustilide attenuates vascular inflammation and activates Nrf2/HO-1 induction and, NO synthesis in HUVECs. *Phytomedicine*, 38, 12–23
- Damtoft, S., Franzyk, H., Jensen, S., Nielsen, B. (1993) Iridoids and verbascosides in *Retzia*. *Phytochemistry*, 34, 239–243
- Dimitrova, P., Alipieva, K., Stojanov, K., Milanova, V., Georgiev, M. I. (2019). Plant-derived verbascoside and isoverbascoside regulate Toll-like receptor 2 and 4-driven neutrophils priming and activation. *Phytomedicine*, 55, 105-118
- Deshane, J., Chen, S., Caballero, S., Grochot-Przeczek, A., Was, H., Li Calzi, S., Lach, R., Hock, T. D., Chen, B., Hill-Kapturczak, N., Siegal, G. P., Dulak, J., Jozkowicz, A., Grant, M. B., & Agarwal, A. (2007). Stromal cell-derived factor 1 promotes

- angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism. *The Journal of experimental medicine*, 204(3), 605–618
- Fox, S., Leitch, A. E., Duffin, R., Haslett, C., & Rossi, A. G. (2010). Neutrophil apoptosis: Relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *Journal of Innate Immunity*, 2(3), 216–227
- Gabr, S., Nikles, S., Eva Maria Wenzig, Ardjomand-Woelkart, K., Hathout, R. M., El-Ahmady, S. H., Amira Abdel Motaal, Abdel, & Bauer, R. (2018). Characterization and optimization of phenolics extracts from Acacia species in relevance to their anti-inflammatory activity. *Biochemical Systematics and Ecology*, 78, 21–30.
- Gao, K., Zxa, W.-L., Zxy, J.-X., Zheng, C., Zi, J.-C. (2021). A review: biosynthesis of plant-derived labdane-related diterpenoids. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 19(9), 666-674
- Georgiev, Y. N., Ognyanov, M. H., Denev, P. N. (2020). The ancient Thracian endemic plant *Haberlea rhodopensis* Friv. and related species: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 249, 112359
- Goldstein, Leonard D., Lee, J., Gnad, F., Klijn, C., Schaub, A., Reeder, J., Daemen, A., Bakalarski, Corey E., Holcomb, T., Shames, David S., Hartmaier, Ryan J., Chmielecki, J., Seshagiri, S., Gentleman, R., & Stokoe, D. (2016). Recurrent Loss of NFE2L2 Exon 2 Is a Mechanism for Nrf2 Pathway Activation in Human Cancers. *Cell Reports*, 16(10), 2605–2617.
- Guan, F., Wang, H., Shan, Y., Chen, Y., Wang, M., Wang, Q., Yin, M., Zhao, Y., Feng, X., & Zhang, J. (2014). Inhibition of COX-2 and PGE2 in LPS-stimulated RAW264.7 cells by Ionimacranthoide VI, a chlorogenic acid ester saponin. *Biomedical Reports*, 2(5), 760–764
- Dell'Orco, M., Milani, P., Arrigoni, L., Pansarasa, O., Sardone, V., Maffioli, E., Polveraccio, F., Bordoni, M., Diamanti, L., Ceroni, M., Peverali, F. A., Tedeschi, G., & Cereda, C. (2016). Hydrogen peroxide-mediated induction of SOD1 gene transcription is independent from Nrf2 in a cellular model of neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1859(2), 315–323
- Jensen, S. (1996) Caffeoyl phenylethanoid glycosides in *Sanango racemosum* and in the Gesneriaceae. *Phytochemistry*, 43, 777–783
- Jung, B., Yoo, H.-S., Soo Young Shin, Park, Y.-J., Jeon, S. (2018). Dysregulation of NRF2 in Cancer: from Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Biomolecules and Therapeutics*, 26(1), 57-68
- Li, J., Wang, R., Zhao, L., Wang, M., Wang, R., Guo, D., Yang, Y., Li, Y., Guan, N., Shi, Y., Xia, X., & Shi, C. (2022). Stress tolerance and transcriptomic response analysis of *Yersinia enterocolitica* adapted to *Origanum vulgare* L. essential oil. *LWT*, 168, 113930
- Lui, J., Li, X., Bai, H., Yang, X., Mu, J., Yan, R., Wang, S. (2023). Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and pharmacokinetics of the root bark of *Paeonia x suffruticosa andrews*: A comprehensive review. *Journal of Ethnopharmacology*, 308, 116279
- Liu, Y., Duan, C., Chen, H., Wang, C., Liu, X., Miao Zhen Qiu, Tang, H., Zhang, F., Zhou, X., Yang, J. (2018). Inhibition of COX-2/mPGES-1 and 5-LOX in macrophages by leonurine ameliorates monosodium urate crystal-induced inflammation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 351, 1–11
- Leininger, G. M., Edwards, J. L., Lipshaw, M. J., Feldman, E. L. (2006). Mechanisms of Disease: mitochondria as new therapeutic targets in diabetic neuropathy. *Nature Clinical Practice Neurology*, 2(11), 620-628
- Liu, Y., Duan, C., Chen, H., Wang, C., Liu, X., Miao Zhen Qiu, Tang, H., Zhang, F., Zhou, X., Yang, J. (2018). Inhibition of COX-2/mPGES-1 and 5-LOX in macrophages by

- leonurine ameliorates monosodium urate crystal-induced inflammation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 351, 1-11
- Luo, J., Wang, J., Zhang, J., Sang, A., Ye, X., Cheng, Z., Li, X. (2022). Nrf2 Deficiency Exacerbated CLP-Induced Pulmonary Injury and Inflammation through Autophagy- and NF- κ B/PPAR γ -Mediated Macrophage Polarization. *Cells*, 11(23), 3927
- Jazayeri, S., Khosravi-Darani, K., Solati, Z., Mohammadpour, N., Tehrani-Doost, M., Hosseini, M., Asemi, Z., Adab, Z., Djalali, M., Eghtesadi, S., Mohammadi, A. (2015). Effects of probiotics on biomarkers of oxidative stress and inflammatory factors in petrochemical workers: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *International Journal of Preventive Medicine*, 6(1), 82
- Joshi N, Werner S (2017) Nrf2 is highly expressed in neutrophils, but myeloid cell-derived Nrf2 is dispensable for wound healing in mice. *Plos one*, 12(10): e0187162
- Katsumata, Y., Kanzaki, H., Honda, Y., Tanaka, T., Yamaguchi, Y., Itohiya, K., Fukaya, S., Miyamoto, Y., Narimiya, T., Wada, S., Nakamura, Y. (2018). Single local injection of epigallocatechin gallate-modified gelatin attenuates bone resorption and orthodontic tooth movement in mice. *Polymers*, 10(12), 1384
- Kaidanovich-Beilin, O., and Woodgett, J. R. (2011). GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 4
- Karmakar, M., Minns, M., Greenberg, E. N., Diaz-Aponte, J., Pestonjamas, K., Johnson, J. L., Rathkey, J. K., Abbott, D. W., Wang, K., Shao, F., Catz, S. D., Dubyak, G. R., & Pearlman, E. (2020). N-GSDMD trafficking to neutrophil organelles facilitates IL-1 β release independently of plasma membrane pores and pyroptosis. *Nature Communications*, 11(1), 2212
- Kemberling, J. A., Hampton, J. A., Keck, R. W., Gomez, M. A., & Selman, S. H. (2003). Inhibition of Bladder Tumor Growth by the Green Tea Derivative Epigallocatechin-3-Gallate. *The Journal of Urology*, 170(3), 773–776
- Khan, N. M., Haseeb, A., Ansari, M. Y., Devarapalli, P., Haynie, S., Haqqi, T. M. (2017). Wogonin, a plant derived small molecule, exerts potent anti-inflammatory and chondroprotective effects through the activation of ROS/ERK/Nrf2 signaling pathways in human Osteoarthritis chondrocytes. *Free Radical Biology & Medicine*, 106, 288-301
- Kobayashi, A., Kang, M.-I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., Yamamoto, M. (2004). Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Molecular and Cellular Biology*, 24(16), 7130-7139
- Kofidis, G., Bosabalidis, A. M. (2012). Seasonal distribution of phenolics in leaves of aromatic plants (*Origanum vulgare* L., *Mentha spicata* L., *Clinopodium vulgare* L.) and their ecophysiological implications. *Biolet*, 49(1), 65-72
- Kulabas, S. S., Ipek, H., Tufekci, A. R., Arslan, S., Demirtas, I., Ekren, R., Sezerman, U., Tumer, T. B. (2018). Ameliorative potential of *Lavandula stoechas* in metabolic syndrome via multitarget interactions. *Journal of Ethnopharmacology*, 223, 88-98
- Kwak, M. S., Kim, H. S., Lee, B., Kim, Y. H., Son, M., & Shin, J. S. (2020). Immunological Significance of HMGB1 Post-Translational Modification and Redox Biology. *Frontiers Immunology*, 11, 1189
- Malhotra, D., Portales-Casamar, E., Singh, A., Srivastava, S., Arenillas, D., Happel, C., Shyr, C., Wakabayashi, N., Kensler, T. W., Wasserman, W. W., Biswal, S. (2010). Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Research*, 38(17), 5718-5734
- Manukyan, L., Montandon, S. A., Fofonjka, A., Smirnov, S., & Milinkovitch, M. C. (2017). A living mesoscopic cellular automaton made of skin scales. *Nature*, 544(7649), 173–179

- Marchev, A. S., Vasileva, L. V., Amirova, K. M., Savova, M. S., Balcheva-Sivenova, Z. P., and Georgiev, M. I. (2021). Metabolomics and health: from nutritional crops and plant-based pharmaceuticals to profiling of human biofluids. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(19-20), 6487-6503
- Marinovic, M. P., Morandi, A. C., & Otton, R. (2015). Green tea catechins alone or in combination alter functional parameters of human neutrophils via suppressing the activation of TLR-4/NFκB p65 signal pathway. *Toxicology in vitro*, 29(7), 1766–1778
- McFadden, D., Riggs, D., Jackson, B., & Cunningham, C. (2006). Additive effects of Cox-1 and Cox-2 inhibition on breast cancer *in vitro*. *International Journal of Oncology*, 29, 1019-1023
- Michaluart, P., Masferrer, J. L., Carothers, A. M., Subbaramaiah, K., Zweifel, B. S., Koboldt, C., Mestre, J. R., Grunberger, D., Sacks, P. G., Tanabe, T., & Dannenberg, A. J. (1999). Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. *Cancer Research*, 59(10), 2347–2352
- Micota, B., Sadowska, B., Podsędek, A., Paszkiewicz, M., Sosnowska, D., Różalska, B. (2016). Is it true that plant-derived polyphenols are always beneficial for the human? *In vitro* study on Leonurus cardiaca extract properties in the context of the pathogenesis of Staphylococcus aureus infections. *Journal of Medical Microbiology*, 65(10), 1171-1181
- Mohseni, H., Zaslau, S., McFadden, D., Riggs, D. R., Jackson, B. J., & Kandzari, S. (2004). COX-2 inhibition demonstrates potent anti-proliferative effects on bladder cancer *in vitro*. *Journal of Surgical Research*, 119(2), 138–142
- Morteza-Semnani, K., and Ghanbarimasir, Z. (2019). A review on traditional uses, phytochemistry and pharmacological activities of the genus Ballota. *Journal of Ethnopharmacology*, 233, 197-217
- Mullen, L., Hanschmann, E. M., Lillig, C. H., Herzenberg, L. A., & Ghezzi, P. (2015). Cysteine Oxidation Targets Peroxiredoxins 1 and 2 for Exosomal Release through a Novel Mechanism of Redox-Dependent Secretion. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 21(1), 98–108.
- Nakaso, K. (2004). p53-mediated mitochondrial dysfunction by proteasome inhibition in dopaminergic SH-SY5Y cells. *Neuroscience Letters*, 354(3), 213-216
- Nicoletti, M., Galeffi, C., Multari, G., Garbarino, J., Gambaro, V. (1988) Polar constituents of *Calceolaria ascendens*. *Planta Medica*, 54, 347–348
- Pan, S.-Y., Litscher, G., Gao, S.-H., Zhou, S.-F., Yu, Z.-L., Chen, H.-Q., Zhang, S.-F., Tang, M.-K., Sun, J.-N., Ko, K.-M. (2014). Historical perspective of traditional indigenous medical practices: The current renaissance and conservation of herbal resources. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014(525340), 1-20
- Pan, H., Guan, D., Liu, X., Li, J., Wang, L., Wu, J., Zhou, J., Zhang, W., Ren, R., Zhang, W., Li, Y., Yang, J., Hao, Y., Yuan, T., Yuan, G., Wang, H., Ju, Z., Mao, Z., Li, J., Qu, J. (2016). SIRT6 safeguards human mesenchymal stem cells from oxidative stress by coactivating NRF2. *Cell Research*, 26(2), 190-205
- Park, C. M., & Yoon, H.-S. (2022). Chlorogenic Acid as a Positive Regulator in LPS-PG-Induced Inflammation via TLR4/MyD88-Mediated NF-κB and PI3K/MAPK Signaling Cascades in Human Gingival Fibroblasts. *Mediators of Inflammation*, 1–8
- Pae, H. O., & Chung, H. T. (2009). Heme oxygenase-1: its therapeutic roles in inflammatory diseases. *Immune network*, 9(1), 12–19
- Ricón, F.J., Lajara, F., Fuentes, A. et al. (2018) Pyrocarbon arthroplasty in acute unreconstructable radial head fractures: mid-term to long term results. *Journal of orthopaedics and traumatology*, 19, 13

- Rincón, E., Rocha-Gregg, B. L., Collins, S. R. (2018). A map of gene expression in neutrophil-like cell lines. *BMC Genomics*, 19(1)
- Robledinos-Antón, N., & Cuadrado, A. (2016). Role of the redox signaling in self-renewal and multipotency of neural stem cells: implications in aging and Alzheimer's Disease
- Robledinos-Antón, N., Fernández-Ginés, R., Manda, G., Cuadrado, A. (2019). Activators and inhibitors of NRF2: A Review of their potential for clinical development. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1-20
- Rhee, S.G., Yang, K.S., Kang, S.W., Woo, H. A., Chang, T. H. (2005) Controlled Elimination of Intracellular H₂O₂: Regulation of Peroxiredoxin, Catalase, and Glutathione Peroxidase via Post-translational Modification. *Antioxidants & Redox Signaling*, 619-626.
- Salem, M. A., Perez de Souza, L., Serag, A., Fernie, A. R., Farag, M. A., Ezzat, S. M., & Alseekh, S. (2020). Metabolomics in the context of plant natural products research: From sample preparation to metabolite analysis. *Metabolites*, 10(1), 37
- Thimmulappa, R. K., Mudnakudu-Nagaraju, K. K., Shivamallu, C., Subramaniam, K. J. T., Radhakrishnan, A., Bhojraj, S., & Kuppusamy, G. (2021). Antiviral and immunomodulatory activity of curcumin: A case for prophylactic therapy for COVID-19. *Heliyon*, 7(2), e06350.
- Uchida, K., Takano, S., Matsumoto, T. *et al.* (2017) Transforming growth factor activating kinase 1 regulates extracellular matrix degrading enzymes and pain-related molecule expression following tumor necrosis factor- α stimulation of synovial cells: an *in vitro* study. *BMC Musculoskelet Disord* 18, 283
- Timoteo, P., Karioti, A., Leitão, S. G., Vincieri, F. F., Bilia, A. R. (2015). A validated HPLC method for the analysis of herbal teas from three chemotypes of Brazilian *Lippia alba*. *Food Chemistry*, 175, 366-373
- Tonelli, C., Chio, I. I. C., Tuveson, D. A. (2018). Transcriptional regulation by Nrf2. *Antioxidants and Redox Signaling*, 29(17), 1727-1745
- Tsai, J. J., Dudakov, J. A., Takahashi, K., Shieh, J. H., Velardi, E., Holland, A. M., Singer, N. V., West, M. L., Smith, O. M., Young, L. F., Shono, Y., Ghosh, A., Hanash, A. M., Tran, H. T., Moore, M. A., & van den Brink, M. R. (2013). Nrf2 regulates haematopoietic stem cell function. *Nature cell biology*, 15(3), 309–316
- Wagner, G., Lehmann, C., Bode, C., Miosge, N., & Schubert, A. (2021). High Mobility Group Box 1 Protein in Osteoarthritic Knee Tissue and Chondrogenic Progenitor Cells: An Ex Vivo and *In vitro* Study. *Cartilage*, 12(4), 484–495
- Wang, H., Feng, F., Guo, Y., Shuang, S., Choi, M. M. F. (2013). HPLC-UV quantitative analysis of acrylamide in baked and deep-fried Chinese foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31(1), 7-11
- Wang, L., Chen, Y., Sternberg, P., & Cai, J. (2008). Essential Roles of the PI3 Kinase/Akt Pathway in Regulating Nrf2-Dependent Antioxidant Functions in the RPE. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49(4), 1671
- Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Kang, M.-I., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Kensler, T. W., Talalay, P. (2004). Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: Fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(7), 2040-2045
- Watanabe, S., Hristelina Ilieva, Hiromi Tamada, Nomura, H., Okiru Komine, Endo, F., Jin, S., Mancias, P., Hiroshi Kiyama, & Yamanaka, K. (2016). Mitochondria-associated membrane collapse is a common pathomechanism in SIGMAR 1 - and SOD 1 -linked ALS. *EMBO Molecular Medicine*, 8(12), 1421–1437

- Wu, A., Yang, Z., Huang, Y., Yuan, H., Lin, C., Wang, T., Zhao, Z., Zhou, Y., Zhu, C. (2020). Natural phenylethanoid glycosides isolated from *Callicarpa kwangtungensis* suppressed lipopolysaccharide-mediated inflammatory response via activating Keap1/Nrf2/HO-1 pathway in RAW 264.7 macrophages cell. *Journal of Ethnopharmacology*, 258, 112857
- Volchuk, A., Ye, A., Chi, L., Steinberg, B. E., and Goldenberg, N. M. (2020). Indirect regulation of HMGB1 release by gasdermin D. *Nature communications*, 11(1), 4561
- Vrchovská, V., Spilková, J., Valentão, P., Sousa, C., Andrade, P. B., & Seabra, R. M. (2007). Antioxidative properties and phytochemical composition of *Ballota nigra* infusion. *Food Chemistry*, 105(4), 1396–1403
- Yamaguchi, M., & Levy, R. J. (2016). The combination of β -caryophyllene, baicalin and catechin synergistically suppresses the proliferation and promotes the death of RAW267.4 macrophages *in vitro*. *International Journal of Molecular Medicine*, 38(6), 1940–1946
- Xiao, Y., Ding, L., Yin, S., Huang, Z., Zhang, L., Mei, W., Wu, P., Wang, P., & Pan, K. (2021). Relationship between the pyroptosis of fibroblast-like synoviocytes and HMGB1 secretion in knee osteoarthritis. *Molecular Medicine Reports*, 23(2), 97
- Zhao, H., Wu, X., Huang, Y., Zhang, P., Tian, Q., & Liu, J. (2021). Investigation of moisture transport in cement-based materials using low-field nuclear magnetic resonance imaging. *Magazine of Concrete Research*, 73(5), 252–270
- Znati, M., Ben Jannet, H., Cazaux, S., Souchard, J., Harzallah Skhiri, F., Bouajila, J. (2014). Antioxidant, 5-lipoxygenase inhibitory and cytotoxic activities of compounds isolated from the *Ferula lutea* flowers. *Molecules*, 19(10), 16959-16975
- Zheng, Y., Li, L., Chen, B. *et al.* (2022) Chlorogenic acid exerts neuroprotective effect against hypoxia-ischemia brain injury in neonatal rats by activating Sirt1 to regulate the Nrf2-NF- κ B signaling pathway. *Cell Commun Signal* 20, 84
- Zhu, Ht., Bian, C., Yuan, Jc. *et al.* (2014) Curcumin attenuates acute inflammatory injury by inhibiting the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway in experimental traumatic brain injury. *Journal of neuroinflammation*, 11, 59
- Zhu, W., Tang, H., Cao, L., Zhang, J., Li, J., Ma, D., Guo, C. (2022). Epigallocatechin-3-O-gallate ameliorates oxidative stress-induced chondrocyte dysfunction and exerts chondroprotective effects via the Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway. *Chemical Biology and Drug Design*, 100(1), 108-120