

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ
„СТЕФАН АНГЕЛОВ“



инж. Иванка Костадинова Койчева

АНТИПСОРИАТИЧНА АКТИВНОСТ НА РАСТИТЕЛНИ
***ИН ВИТРО* СИСТЕМИ ОТ *LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* И**
***HARPAGOPHYTUM PROCUMBENS*, И ТЕХНИ**
БИОЛОГИЧНО-АКТИВНИ МЕТАБОЛИТИ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научната
степен “доктор” по професионално направление 5.11. Биотехнологии
(Технология на биологично-активните вещества)

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

Пловдив, 2025



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ
„СТЕФАН АНГЕЛОВ“



инж. Иванка Костадинова Койчева

**АНТИПСОРИАТИЧНА АКТИВНОСТ НА РАСТИТЕЛНИ
ИН ВИТРО СИСТЕМИ ОТ *LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* И
HARPAGOPHYTUM PROCUMBENS, И ТЕХНИ
БИОЛОГИЧНО-АКТИВНИ МЕТАБОЛИТИ**

АВТОРЕФЕРАТ

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

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

Членове на научното жури: доц. д-р Милка Милева

проф. д-р Петя Димитрова

проф. д-р Велизар Гочев

доц. д-р Диляна Николова

доц. д-р Жени Йорданова

Пловдив, 2025

Дисертационният труд е написан на 138 страници. Той е онагледен с 34 фигури и 6 таблици. Цитирани са 268 литературни източника.

Дисертационният труд е одобрен и насрочен за защита от национален научен семинар по „Приложна микробиология и микробни биотехнологии“ при Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН, чието заседание се състоя се на 22.10.2025 година.

Докторантът е отчислен с право на защита със Заповед № I-185/17.12.2024 година на директора на ИМикБ – БАН, Проф. д-р Пенка Петрова, дн.

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

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

Съдържание	
Използвани съкращения и символи	4
I. ВЪВЕДЕНИЕ	6
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	7
1. Цел	7
2. Задачи	7
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	8
1. Материали, стандарти и разтворители	8
2. Методи	8
IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ	15
1. Химично охарактеризиране и <i>ин витро</i> определяне на антипсориатичния потенциал и механизъм на действие на биотехнологично получен екстракт от <i>L. angustifolia</i> и RA	15
2. Химично охарактеризиране и <i>ин витро</i> определяне на антипсориатичния потенциал и механизъм на действие на биотехнологично получен екстракт от <i>H. procumbens</i> , вербаскозид и левкосептозид А	26
3. <i>Ин vivo</i> валидиране на противовъзпалителния ефект на розмаринова киселина	39
4. Заключение	46
V. ИЗВОДИ	48
VI. ПРИНОСИ	49
Благодарности	50
Публикувани материали по темата на дисертацията	51

Използвани съкращения и символи

Използвани съкращения на български език

BETX	Високоэффективна течна хроматография
иРНК	Информационна рибонуклеинова киселина
РНК	Рибонуклеинова киселина
ЯМР	Ядрено-магнитен резонанс

Използвани съкращения на английски език

ΔG	Свободна енергия на свързване
AKT	Протеин киназа В
CCL	Лиганд за хемокинов рецептор със C-C мотив
CD ₃ OD	Деутериран метанол
COSY	Двумерна хомоядрена корелационна спектроскопия
CXCL	Лиганд за хемокинов рецептор със C-X-C мотив
DEXA	Дексаметазон
DMSO	Диметилсулфоксид
HaCaT	Клетъчната линия човешки епидермални кератиноцити
HSQC	Двумерна хетероядрена корелационна спектроскопия за определяне на взаимодействия през една връзка
IFN	Интерферон
I κ B	Инхибиторна единица на NF- κ B
IKK	Киназен комплекс на инхибиторна единица I κ B
IL	Интерлевкин
IMQ	Имиквимод

JAK	Янус киназа
Ki	Афинитетна константа
Ki67	Маркер за пролиферация
LEU	Левкосептозид А
MAPK	Митоген-активирана протеин киназа
MCP1	Моноцитен хемоатрактантен протеин 1
mTOR	Механистична мишена на рапамицин
NF-κB	Ядрен фактор капа В
PASI	Индекс за засегната площ и тежест на псориазис
PI3K	Фосфатидилинозитол 3-киназа
PMA	Форбол 12-миристат 13-ацетат
RA	Розмаринова киселина
RT-qPCR	Количествена полимеразна верижна реакция в реално време
SEM	Стандартна грешка на средната стойност
STAT	Сигнален преобразувател и активатор на транскрипция
TCA	Трикарбоксилни киселини
TOCSY	Обща хомоядрена корелационна спектроскопия
VER	Вербаскозид

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Псориазисът е хронично имунно-медирано заболяване с кожни и ставни прояви, засягащо приблизително 2-3% от световното население. Клиничните симптоми включват най-често характерни псориаатични лезии по кожата. Псориазисът е свързан с множество съпътстващи заболявания като псориаатичен артрит, затлъстяване, сънна апнея, депресия и някои автоимунни заболявания. Значимостта на болестта произтича от широкото ѝ разпространение, свързаното с нея значително влошаване на качеството на живот на пациентите и съответно високата социална тежест, поради което псориазисът е признат за значимо незаразно заболяване от Световната здравна организация.

Одобрените медикаменти за лечение на заболяването включват ретиноиди, кортикостероиди и няколко имунно-базирани лекарства, които остават основно средство за лечение. Възможността за развитие на лекарствена резистентност и съпътстващите неблагоприятни ефекти на конвенционалната антипсориаатична терапия засилват интереса към нови алтернативни методи за контрол на заболяването чрез прилагане на естествени продукти. Ролята на възпалението при това заболяване предполага, че лечебните растения и природните съединения с противовъзпалителна активност могат да бъдат ефективни за неговото повлияване. Освен това, модулирането на пътищата на възпаление при кератиноцитите може също да бъде една от насоките за ефективен терапевтичен подход при псориазис. В настоящия дисертационен труд чрез съвременни „омикс“ подходи е изследвана биологичната активност на екстракти от *in vitro* системи на растителни видове с известна противовъзпалителна активност *Lavandula angustifolia* Mill. (лавандула) и *Harpagophytum procumbens* (Burch.) DC. ex Meisn. (дяволски нокът) и на техни биологично-активни метаболити в *in vitro* модел на псориазис при човешки кератиноцити. Проучени са и молекулярните механизми на тяхното действие. Допълнително е валидиран *in vivo* противовъзпалителният потенциал на розмаринова киселина на ниво организъм. Изборът за анализ на биотехнологично получени екстракти е направен в контекста на: ограничеността на природните ресурси и ниското съдържание на фармацевтично значими съединения в диворастящите растителните източници; възможност за получаване на растителен материал с относително постоянен количествен и качествен състав; и интегриране на *in vitro* растителните системи за биосинтез на съединения с висока биологична стойност като розмаринова киселина.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

1. Цел

Настоящото проучване има за цел да изследва фармакологичния потенциал на екстракти от *ин vitro* култури на *L. angustifolia* и *H. procumbens*, както и на техни биологично-активни вещества (съответно розмаринова киселина, вербаскозид и левкосептозид А) в *ин vitro* модел на псориазис при човешки кератиноцити, както и ефекта от локално приложение на розмаринова киселина в индуциран с имиквимод (IMQ) модел на псориазис при мишки.

2. Задачи

- 2.1. Получаване и метаболитно профилиране чрез ядрено-магнитен резонанс (ЯМР) на екстракти от *ин vitro* системи на *L. angustifolia* и *H. procumbens*.
- 2.2. Изолиране на биологично-активно съединение от екстракти от *ин vitro* системи на *H. procumbens*.
- 2.3. Адаптиране на *ин vitro* модел на псориаитично възпаление чрез комбинирано стимулиране с цитокини на клетъчна линия човешки епидермални кератиноцити (HaCaT).
- 2.4. Изследване на противовъзпалителна активност и молекулярен механизъм на действие на екстракти от клетъчни суспензии на *L. angustifolia*, *H. procumbens* и техни индивидуални чисти съединения в *ин vitro* модел на псориазис при човешки кератиноцити.
- 2.5. Адаптиране на индуциран с имиквимод модел на псориазис при мишки.
- 2.6. Изследване на антипсориаитичния потенциал на розмаринова киселина на организмово ниво при *ин vivo* модел на псориазис.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали, стандарти и разтворители

Деутерираният метанол (CD₃OD, 99.8%) и деутерираната вода (D₂O, 99.9%) са закупени от Deutero GmbH (Кастелаун, Германия). Всички използвани материали, стандарти, розмаринова киселина (RA) и разтворители са получени от Merck KGaA (Дармщат, Германия). Рекомбинантните човешки протеини rhIL-17A (#ENZ-PRT188) и rhIL-22 (#ENZ-PRT250) са получени от Enzo Life Sciences AG (Лаузен, Швейцария), а rhIFN- γ (#10067-IF) е доставен от R&D Systems (Минеаполис, Минесота, САЩ). Чистото съединение вербаскозид (VER, чистота $\geq 95\%$; #4994 S) е доставено от Extrasynthese (Геней, Франция). Левкосептозид А (LEU) е изолиран (0.045 g/23.4 g екстракт, съответно 0.045 g/50 g биомаса) от фракции от дяволски нокът чрез колонна хроматография при ниско налягане (колони Merck Lobar RP-8 и RP-18), при елуиране с градиент вода/метанол, както е описано по-рано от Georgiev и сътр. (2010). Съставките на формулировката за локално приложение (изброени в Таблица 1) са с фармакологичен клас и са доставени от местни дистрибутори. Крем Aldara (MedA AB, Солна, Швеция) е закупен от аптечната мрежа (Пловдив, България).

1.1. Антитела

Първичните антитела срещу протеините AKT, JAK2, PI3K, STAT1 и фосфо-STAT1 (#9272; #3230S; #4257; #14994; #7649) са получени от Cell Signaling Technology (Лайден, Холандия). Буферите и химикалите за извършване на електрофореза, имуоблот анализ, антителата срещу референтните протеини – тубулин (#12004166) и β -актин (#AHP2417) са доставени от Bio-Rad Laboratories Inc. (Херкулес, Калифорния, САЩ). За флуоресцентна детекция е използвано вторично анти-заешко антитяло IgG Star-Bright Blue 700 (#12004162) от Bio-Rad Laboratories Inc. Приложени са протоколи за работа с тях, описани по-рано от Vasileva и сътр. (2020).

2. Методи

2.1. Култивиране и екстракция на клетъчни суспензии от *L. angustifolia* и *H. procumbens*

Суспензионните култури от лавандула и дяволски нокът са култивирани, както е съобщено по-рано, на течна хранителна среда Linsmayer и Skoog (LS), с добавени 0.2 mg/L 2,4-дихлорфеноксиоцетна киселина и 30 g/L захароза, на тъмно, при 26 °C, и с разбъркване на орбитална клатачка при 110 rpm (Georgiev et al., 2006; Stancheva et al., 2011). След култивиране от клетъчните суспензии е събрана биомаса чрез филтруване и клетъчният материал е замразен и лиофилизиран. Проведена е последваща екстракция на сухата

биомаса с 50% метанол:вода при обработка с ултразвук на стайна температура за 20 min. Полученият екстракт е филтруван и концентриран чрез ротационен вакуум изпарител при 40 °C (Georgiev et al., 2006; Stancheva et al., 2011). Впоследствие е лиофилизиран и съхранен при -20 °C преди извършване на химичен анализ и биологични тестове.

2.2. Фитохимичен анализ на екстракти от *L. angustifolia* и *H. procumbens*

2.2.1. Метаболитно профилиране на база ЯМР спектроскопия

Анализът с ЯМР е извършен съгласно протокол, описан от Georgiev и сътр. (2015). Протонният ¹H ЯМР спектър, както и двумерните – *J*-resolved, хомоядрена (COSY) и хетероядрена (HSQC) корелационни спектроскопии са отчетени при 25 °C на спектрометър Bruker AVII + 600 (Брукер, Карлсруе, Германия), работещ на 600.13 MHz протонна честота, с 4.07 s време за релаксация в CD₃OD.

2.2.2. Хроматографски анализ чрез високоефективна течна хроматография (BETX)

Количественото определяне на съдържанието на RA в екстракта от *L. angustifolia*, и VER и LEU в екстракта от дяволски нокът е извършено посредством система за BETX (Waters, Милфорд, Масачузетс, САЩ), контролирана от софтуер Breeze версия 3.30 SPA (Waters). Методът за BETX е валидиран за линейност и чувствителност, включително граница на откриване - LOD и граница на количествено определяне - LOQ. Съдържанието на RA, VER и LEU е определено съответно съгласно протокол, използван от Choi и сътр. (2019) с определени модификации и протокол, докладван от Georgiev и сътр. (2011).

2.3. *Ин силико* докинг анализ

Кристалните структури на изследваните протеини са получени от база данни Protein Data Bank, www.rcsb.org, с достъп на 01.04.2021 г., идентификационните кодове: 6BBV, 1BF5, 1O6L, 5ITD съответно за JAK2, фосфорилиран STAT1 (pSTAT1), AKT и PI3K. Изчисленията относно докинг анализа са направени съгласно протокол описан от Vasileva и сътр. (2020).

2.4. Клетъчна култура, *ин витро* модел на псориазис и третиране

Клетъчната линия човешки епидермални кератиноцити (HaCaT; #330493) е закупена от Cell Line Service GmbH (Епелхайм, Германия). Клетъчната жизнеспособност на HaCaT е определена с МТТ [3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиев бромид; 5 µg/mL] анализ. Клетките са инкубирани със съответните екстракти или индивидуални чисти

съединения: екстракт от *L. angustifolia* (0.1, 1, 10, 20, 50, 100, 500, 1000 µg/mL) или RA (0.1, 1, 5, 10, 20, 50, 100, 1000 µM), или екстракт от дяволски нокът (0.1, 1, 10, 20, 50, 100, 1000 µg/mL), или VER (1, 5, 10, 20, 50, 100 µM), или LEU (1, 5, 10, 20, 50, 100 µM), и за всеки екстракт и всяко чисто съединение със или без стимулиране с коктейл от цитокини – интерферон (IFN)-γ/интерлевкин (IL)-17A/IL-22 в концентрация съответно 1/1/1 ng/mL.

Ин vitro моделът на псориазис е постигнат чрез излагане на HaCaT на въздействието на комбинация от рекомбинантни човешки протеини IFN-γ/IL-17A/IL-22 (всеки по 1 ng/mL; Slivka et al., 2019) в продължение на 1 час за пресъздаване на подобна на псориазис възпалителна среда. След това кератиноцитите допълнително са третирани съответно с екстракт от *L. angustifolia* (20, 40, 100 µg/mL), или RA (5, 10, 25 µM), или екстракт от дяволски нокът (20, 40, 100 µg/mL), или VER, или LEU (и двете вещества 5, 10, 20 µM), или дексаметазон (DEXA; 5 µM), или само с диметилсулфоксид (DMSO; 0.2%). Обхватът на концентрациите на изследваните екстракти и техните активни съединения е определен след оценка на ефекта им върху клетъчната жизнеспособност на кератиноцити HaCaT. Пробите за последващите биологични анализи са събрани на 6-ти и на 24-ти час от третирането, съответно за изолиране на обща рибонуклеинова киселина (РНК) и за екстракция на протеинови лизати. Всеки експеримент е извършен най-малко в три повторения.

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

Тотална РНК от клетки HaCaT е изолирана с помощта на реагент RNeasy[®] RT и е обратно транскрибирана чрез комплект FirstStrand (#PR008) на Canvaх (Кордоба, Испания) за синтез на комплементарна ДНК, съгласно инструкциите на производителя. Като референтни гени са приложени *GAPDH* и *TUBB*, и са послужили за нормализиране на експресиите на всички останали гени.

2.6. Имуноблот анализ

Протеиновите лизати са приготвени с RIPA буфер, съдържащ инхибиторен коктейл на протеази и фосфатази (1%). Общата концентрация на протеин е определена чрез колориметричния метод на Брадфорд, описан от Vasileva и сътр. (2020). Равни количества (50 µg на ямка) от общия протеин са разделени чрез вертикална електрофореза и са прехвърлени върху нитроцелулозни мембрани, последвано от блокиране в обезмаслено мляко и от инкубиране с първични антитела срещу АКТ, JAK2, PI3K, STAT1 и p-STAT1. Имунодетекцията е визуализирана със система за изображения ChemiDoc MP (Bio-Rad) и получените образи са анализирани със софтуер Image Lab 6.0.1 (Bio-Rad).

2.7. Приготвяне на емулсия локално приложение

За целите на проучването е създадена формулировка за локално приложение под формата на емулсия (крем) от типа масло във вода (O/W). Формулата е разработена в шест фази (А-Е), като съставът на всяка фаза е посочен в Таблица 1. Маслената фаза (А) е нагрята до 80 °С до пълно разтопяване на маслените компоненти, докато водната фаза (Б) е нагрята отделно при същите условия. Чрез непрекъснато разбъркване, маслената фаза постепенно е включена във водната фаза и получената смес е хомогенизирана. След охлаждане на емулсията до 40 °С, последователно са добавени фази В, Г, Д и Е. Необходимото количество RA е включено в състава на емулсията до създаване на формулировки с крайна концентрация на RA от 0.05, 0.25 и 0.50 %. Също така е приготвен идентичен крем (контрола) без съдържание на RA. Емулсионната стабилност и термостабилност на получените кремове са оценени съгласно стандарт БДС 3741:1980.

Таблица 1. Състав на формулировка за локално приложение със съдържание на RA.

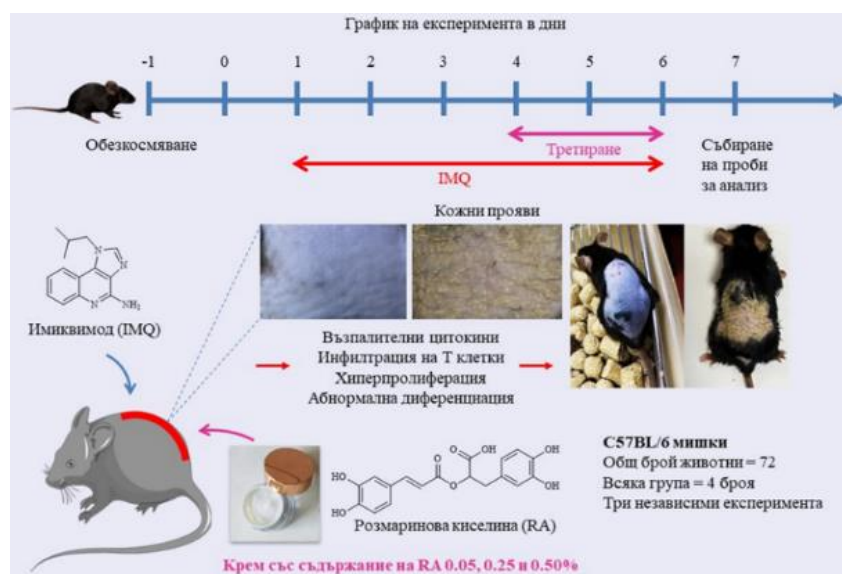
Фаза	Съставки (INCI)	% w/w
А	Cetearyl alcohol	1.0
	Cetyl alcohol	4.0
	Glyceryl stearate, PEG-100 searate	3.0
	Paraffinum liquidum	4.5
	Stearic acid	1.5
Б	Glycerin	1.0
	Tetrasodium EDTA	0.02
	Water	83.58
В	Carbomer	0.2
Г	Triethanolamin	0.2
Д	Phenoxyethanol, ethylheylglycerin	1.0
Е	Rosmarinic acid	q.s.

Легенда: q.s.-колкото е необходимо; %w/w- процентно съдържание в тегловни единици.

2.8. *Ин vivo* модел на псориазис

За установяване на модел на псориазиформен дерматит са използвани мишки C57BL/6 (мъжки пол, на възраст 8-12 седмици; закупени от Jackson Laboratory, СТ, САЩ). *Ин vivo* моделът е постигнат чрез ежедневно локално приложение на 62.5 mg крем Aldara (Meda AB, Швеция), който съдържа 5 % IMQ, доставящ доза от активното съединение от

приблизително 3 mg/мишка/ден, върху обезкосмена кожа на гърба на животните - 2,0 cm² (van der Fits et al., 2009; Gangwar et al., 2022; Köhler et al., 2024). Като позитивна контрола в този експеримент е използван крем със съдържание на 0.05% бетаметазон дипропионат (betamethasone; Мерк Шарп и Доум България ЕООД, София, България). Животните са разпределени на случаен принцип в съответните експериментални групи, с по четири животни в група. Проведени са три независими експеримента - общо 10-12 животни в група. Схема на експеримента е представена на Фигура 1.



Фигура 1. Експериментален дизайн на индуциран с имиквимод псориазиформен дерматит. Моделът на псориазис е предизвикан върху обезкосмената кожа на гърба на C57BL/6 мишки чрез ежедневно локално приложение на имиквимод (IMQ) в продължение на 6 последователни дни. Животните са групирани в шест експериментални групи: здрава контрола, IMQ, IMQ+0.05% RA, IMQ+0.25% RA и IMQ+0.5% RA, IMQ+0.05% betamethasone. Кожата на гърба на всички мишки е обръсната и един ден по-късно е приложен крем с 5% IMQ (62.5 mg) в продължение на шест последователни дни, с изключение на животните от групата - здрава контрола (Healthy mice), третирани с крем без съдържание на RA. От 4-ти ден в съответните експериментални групи локално е нанесен крем, съдържащ RA (0, 0.05, 0.25 и 0.50%) 1 час преди апликацията на IMQ крема.

Експерименталните процедури са проведени във вивариум на ИМикБ-БАН, гр.София (Регистрация - Протокол 352/06.01.2012 г., рег. № 11130005). Животните са отглеждани при условия без специфични патогени, с контролирана температура и осигурен достъп до вода и храна. Опитите с животни са проведени под ветеринарен контрол и в съответствие с националното законодателство (ДВ, бр. 87 от 2006 г. и Указ № 20 от 01.11.2012 г.),

Европейската директива за защита на животните (2010/63/EC) и препоръките за пълно и прозрачно докладване на изследвания, включващи животни - ARRIVE (Изследвания върху животни: отчитане на *in vivo* експерименти). За планираните опити е издадено разрешение № 331 (с валидност до 07.06.2027 г.) от Българската агенция по безопасност на храните.

2.9. Оценка на индекса за площ и тежест на псориазис (PASI)

Степента на псориазис е оценена с помощта на PASI индекса, който се основава на точкова система, отчитаща изменението в цвета на кожата (еритема), лющенето и промяната в нейната дебелина в сравнение със здрава кожа. Използвана е скала за оценка от 0 до 4: 0-без промени; 1-незначителни промени; 2-умерена промяна; 3-значителна промяна; 4-тежки изменения. Тежестта на псориазисното възпаление е определена посредством кумулативния резултат (еритема + лющене + удебеляване) по скалата на van der Fits от 0-12 (van der Fits et al., 2009). Теглото на животните е отчетено на всеки два дни, заедно с промените в дебелината на кожата, зачервяването и лющенето. В края на експеримента (7-ми ден) животните са умъртвени чрез цервикална дислокация и техните слезки, ингвинални и аксиларни лимфни възли са отпрепарирани и претеглени. Кожата на третираните животни е дисектирана и са събрани проби за хистологичен анализ.

2.10. Изолиране на миши Т-клетки от слезка и анализ на клетъчната пролиферация

Слезките от здрави C57BL/6 мишки са дисектирани и е приготвена суспензия от единични клетки. След това Т-лимфоцитите са магнитно отделени от получените клетъчни суспензии, използвайки отрицателна селекция (MS T Lymphocyte Enrichment IMAG DM Set; BD Bioscience, Хайделберг, Германия) съгласно препоръките на производителя. Пречистените Т-клетки (2×10^6 клетки/mL) са инкубирани в присъствието на повишаващи се концентрации на RA (1, 5, 25 μM) за 24 и 48 часа при 37 °C, 5% CO₂. Също така са инкубирани клетки третиран с: форбол 12-миристат 13-ацетат (PMA; 50 ng/mL), PMA/йонна група и DEXA (50 ng/mL/750 ng/mL и DEXA, 5 μM), DEXA (5 μM), DEXA и RA (5 μM и 25 μM), 0.05% DMSO (група с носител) или без никакви допълнителни вещества (контролна група). Анализът на клетъчната пролиферация на Т-клетките е извършен с MTT реагент (5 mg/mL) както е описано по-рано от Boneva и сътр (2023).

2.11. Хистологична оценка на псориазисните кожни лезии

Третираният участък от кожата на експерименталните животни е отделен и са взети биопсии от кожните лезии, които след фиксиране във формалин и включване в парафин, са

използвани за последващ хистологичен анализ. Кожните проби (6 mm) от опитните животни са фиксирани в 10% буфериран формалин рН 7.0. След промиване, тестовият материал е подготвен за включване в парафин чрез дехидратиране с нарастваща алкохолна концентрация (45 min в 70% разтвор на етанол; 45 min в 80% разтвор на етанол; 45 min в 95% разтвор на етанол; 2x60 min в чист 100% етанол; 2x60 min в заместител на ксилол; 3x60 min в течен парафин при 58 °C) в автоматичен процесор за тъкани от Leica Biosystems (Нуслох, Германия). След това от парафиновите блокчета с анализирани тъкани са получени хистологични срезове с дебелина 5-7 μ m чрез ръчен ротационен микротом Leica RM2125 RTS (Leica Biosystems, Вецлар, Германия). Получените препарати от всички експериментални групи са депарафинизирани и оцветени с хематоксилин и еозин. За определяне на дебелината на епидермиса на всяка проба е използван алгоритъм, с помощта на софтуера ImageJ за изчисляване на площта на епидермиса, разделена на неговата дължина (Jabeen et al., 2020).

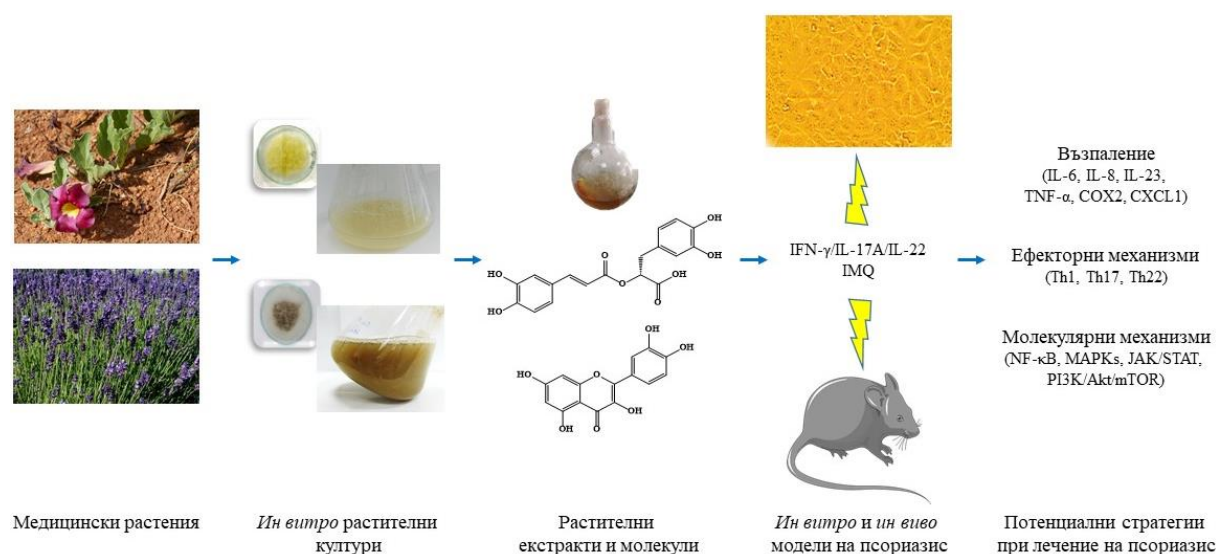
2.12. Статистически анализ на данните

Статистическа оценка на получените данни от проведените *ин vitro* експерименти е извършена със софтуер SigmaPlot v11.0 (Systat Software GmbH, Еркрат, Германия) и резултатите са представени като средната аритметична стойност $\pm$ стандартна грешка на средната стойност (SEM). Различията между групите са определени с несдвоен тест Student' t-test по целесъобразност или с еднопосочен анализ на вариациите (ANOVA). При наличие на нормалност в разпределението между-груповите различия са сравнени посредством еднофакторен дисперсионен анализ (one-way ANOVA analysis of variance), последван от анализ Bonferroni's post hoc, когато са сравнени повече от две групи.

Оценка на получените данни от проведените *ин vivo* експерименти е извършена с помощта на софтуер GraphPad Prism, (Сан Диего, Калифорния, САЩ). За статистически сравнителен анализ на повече от две групи и за мултивариабилни анализи са използвани еднопосочния тест ANOVA, последван от Dunnett за сравняване на двойки или тест Tukey за множество сравнение. Резултатите са представени като средна аритметична стойност $\pm$ стандартно отклонение, разликата $p < 0.05$ е приета за статистически значима.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

За постигане на целта на настоящия дисертационен труд е използван обобщеният на Фигура 2 експериментален подход.



Фигура 2. Експериментална стратегия за определяне механизмите на модулиране на възпаление при псориазис чрез прилагане на растителни екстракти и индивидуални чисти съединения.

1. Химично охарактеризиране и *ин vitro* определяне на антипсориазичния потенциал и механизъм на действие на биотехнологично получен екстракт от *L. angustifolia* и RA

Терапевтичният потенциал на екстракт от *L. angustifolia* и на RA е оценен чрез изследване на тяхната биологична активност в предизвикан с комбинация от цитокини IFN- γ /IL-17A/IL-22 модел на псориазис при човешки кератиноцити HaCaT.

1.1. Фитохимично охарактеризиране на биотехнологично получен екстракт от *L. angustifolia*

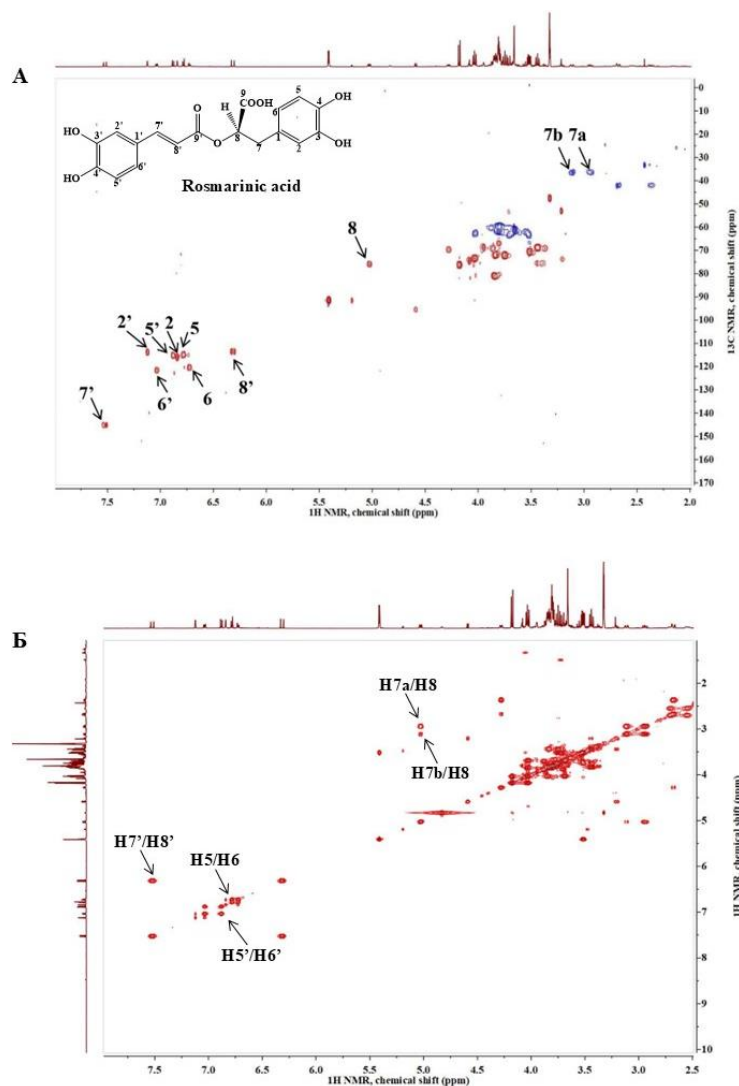
Метаболитното профилиране посредством ЯМР има голям потенциал за изследване на различни биологични системи. В настоящото проучване, екстрактът от клетъчна суспензия на *L. angustifolia* е подложен на фитохимичен анализ, за да се потвърди наличието на RA в него. Според данните от ^1H ЯМР спектър, сигналите с най-висок интензитет в ароматната област отговарят на характерните за RA сигнали, което затвърждава присъствието на тази фенолна киселина като основен вторичен метаболит в екстракта. В алифатния регион (δ 0.5-3.0 ppm) са открити сигнали за органичните оцетна и пирогроздена киселини, а в областта δ 6.5-8.5 ppm присъстват сигнали и за мравчена и фумарова киселини. Идентифицираните метаболити са важни междинни продукти от

цикъла на трикарбоксилните киселини (ТСА), при който идентифицираните във въглехидратната област (δ 3.0-5.5) съединения, като α -, β -глюкоза и захароза са окислени до образуване на пируват. Цикълът на ТСА е и начало на пътищата, водещи до важни структурни метаболити, включително аминокиселините аланин, глутамин, глутамат, треонин и валин, идентифицирани в екстракта (Таблица 2).

Таблица 2. Химични отмествания (δ) и константи на свояване (J) на сигнали за протони в структурата на метаболитите, идентифицирани в екстракт от *L. angustifolia* чрез ЯМР (Georgiev et al., 2015; Marchev et al., 2017; Youssef et al., 2017).

Метаболит	Химично отместване (ppm)	Константа на свояване (Hz)
α -Глюкоза	5.19	(d, $J = 3.7$)
β -Глюкоза	4.59	(d, $J = 7.9$)
γ -Аминобутирова киселина	1.92/2.30/3.01	(m)/(t, $J = 7.2$)/(t, $J = 7.3$)
Аланин	1.49	(d, $J = 7.3$)
Валин	1.01/1.06	(d, $J = 7.1$)/(d, $J = 7.1$)
Глутамат	2.37/2.06	(m)/(m)
Глутамин	2.14/2.37	(m)/(m)
Захароза	5.41/4.18	(d, $J = 3.9$)/(d, $J = 8.9$)
Инозин	8.24/8.35	(s)/(s)
Инозитол	3.95/3.52/3.21	(m)/(m)/(m)
Мравчена киселина	8.48	(s)
Оцетна киселина	1.91	(s)
Пирогроздена киселина	2.43	(s)
Розмаринова киселина	7.12/6.88/7.04/7.52/6.32/6.84/6.78/6.72/2.94/3.1/5.03	(d, $J = 2.1$)/(d, $J = 8.2$)/(dd, $J = 8.4$, 2.1)/(d, $J = 15.9$)/(d, $J = 15.9$)/(d, $J = 2.0$)/(d, $J = 8.1$)/(dd, $J = 8.1$, 2.0)/(dd, $J = 14.4$, 10.0)/(dd, $J = 14.5$, 3.5)/(dd, $J = 10.0$, 3.4)
Треонин	1.33	(d, $J = 6.8$)
Фумарова киселина	6.53	(s)
Холин	3.22	(s)

Освен чрез получените протонни ЯМР-спектри, РА е структурно идентифицирана посредством 2D ЯМР спектри, които предоставят по-пълна и точна информация за съдържащите се в екстракта структури (Фигура 3). Наличието на РА в анализирания екстракт е потвърдено от взаимодействията през една връзка протон-въглерод (пресечни пикове), наблюдавани в HSQC спектъра, показани на Фигура 3А.

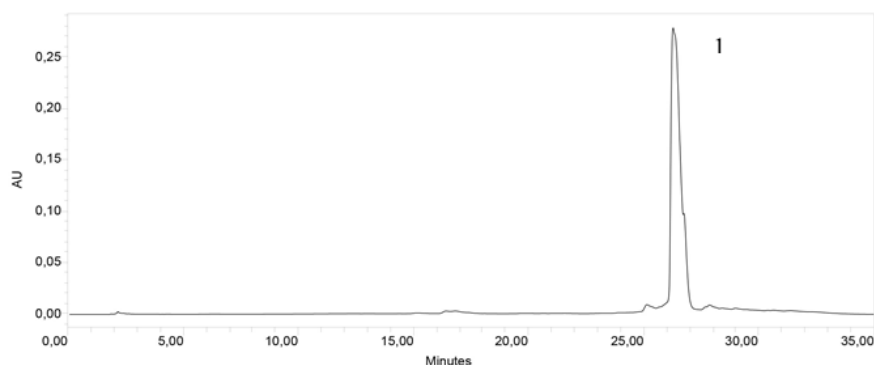


Фигура 3. ЯМР спектри на екстракт от клетъчна суспензия на *L. angustifolia* и характерни сигнали на розмаринова киселина (РА), хетероядрена единична квантова кохерентна спектроскопия (^1H - ^{13}C HSQC; А) и хомоядрена корелационна спектроскопия (^1H - ^1H COSY; Б).

Спектърът на екстракта разкри наличието на пресечни сигнали между дублета при δ_{H} 7.52 и сигнал за въглероден атом при δ_{C} 145.14, както и между дублет при δ_{H} 6.32 и δ_{C} 113.36. Двата дублета са отнесени към двойка *транс*-олефинови протони (H-7' и H -

8') на база голямата константа на взаимодействие ($J = 15.9 \text{ Hz}$), наблюдавана в ^1H ЯМР спектър, показвайки наличието на *транс*-кафеоилов остатък в молекулата. Освен това, системата ABX на кафеената киселина е потвърдена от наблюдаваните пресечни пикове между сигналите за трите ароматни протона H-5', H-6' и H-2' и съответните въглеродни атоми съответно при $\delta_{\text{H}} 6.88/\delta_{\text{C}} 115.21$, $\delta_{\text{H}} 7.04/\delta_{\text{C}} 121.59$ и $\delta_{\text{H}} 7.12/\delta_{\text{C}} 113.84$. Другата ABX система в ароматния регион е отнесена към 3,4-дихидроксифенилния остатък, съгласно пресечните пикове между сигналите за трите протона H-5, H-6 и H-2 и съответните въглеродни атоми, наблюдавани при $\delta_{\text{H}} 6.78/\delta_{\text{C}} 114.87$, $\delta_{\text{H}} 6.72/\delta_{\text{C}} 120.61$ и $\delta_{\text{H}} 6.84/\delta_{\text{C}} 116.02$. Дублетът при $\delta_{\text{H}} 5.03$, имащ корелация със сигнал за въглероден атом при $\delta_{\text{C}} 75.84$ предполага наличието на CH група, свързана с кислороден атом, и този сигнал е отнесен към H-8. Два дублета при $\delta_{\text{H}} 2.94$ и 3.11 имат пресечни пикове със сигнал за един въглероден атом $\delta_{\text{C}} 36.36$, което е указание за наличието на метиленовата група в позиция 7. В допълнение на Фигура 3Б са показани ^1H - ^1H COSY взаимодействия. Установени са кръстосани пикове между H-7'/H-8' ($\delta_{\text{H}} 7.52/\delta_{\text{H}} 6.32$), H6'/H-5' ($\delta_{\text{H}} 7.04/\delta_{\text{H}} 6.88$) и H6/H-5 ($\delta_{\text{H}} 6.72/\delta_{\text{H}} 6.78$), потвърждаващи структурата на RA. Данните са в съгласие с тези в литературата (Xiao et al., 2008; Pereira et al., 2013; Zhao et al., 2021).

Допълнително е определено съдържанието на RA в анализирания екстракт с BETX – $100.16 \pm 7.01 \text{ mg/g}$ сух екстракт (Фигура 4). Методът за BETX е валидиран за линейност и чувствителност в концентрационния диапазон между 10 и 200 $\mu\text{g/mL}$. Стойностите на LOD и LOQ са съответно 6.9 и 14.59 $\mu\text{g/mL}$.

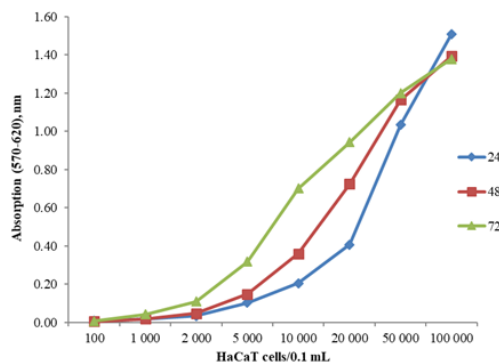


Фигура 4. BETX хроматограма на екстракт от клетъчна суспензия на *L. angustifolia*. Пик 1: розмаринова киселина.

1.2. *Ин витро* оценка на антипсориатичния потенциал на *L. angustifolia* и RA

До сега се знае малко за ролята на RA върху физиологията на кератиноцитите. По-рано е съобщено, че RA противодейства на свързано с ултравиолетова А радиация увреждане в

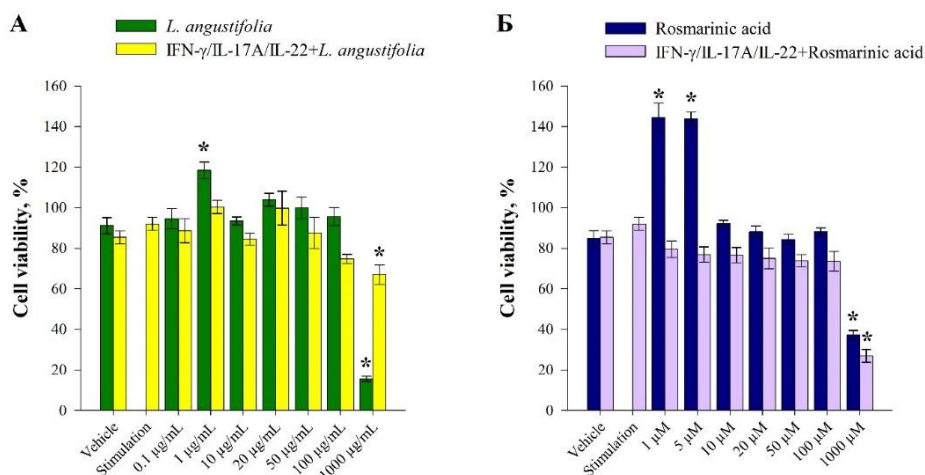
клетки от миши меланом (Sanchez-Campillo et al., 2009), инхибира IFN- γ -индуцираното възпаление в първичните човешки кератиноцити (Georgiev et al., 2012). Като начало на експерименталната работа е проучено развитието на HaCaT. На фигура 5 е представена растежна крива на кератиноцитите на 24-ти, 48-ми и 72-ри час.



Фигура 5. Динамика на растеж на клетъчна линия кератиноцити HaCaT.

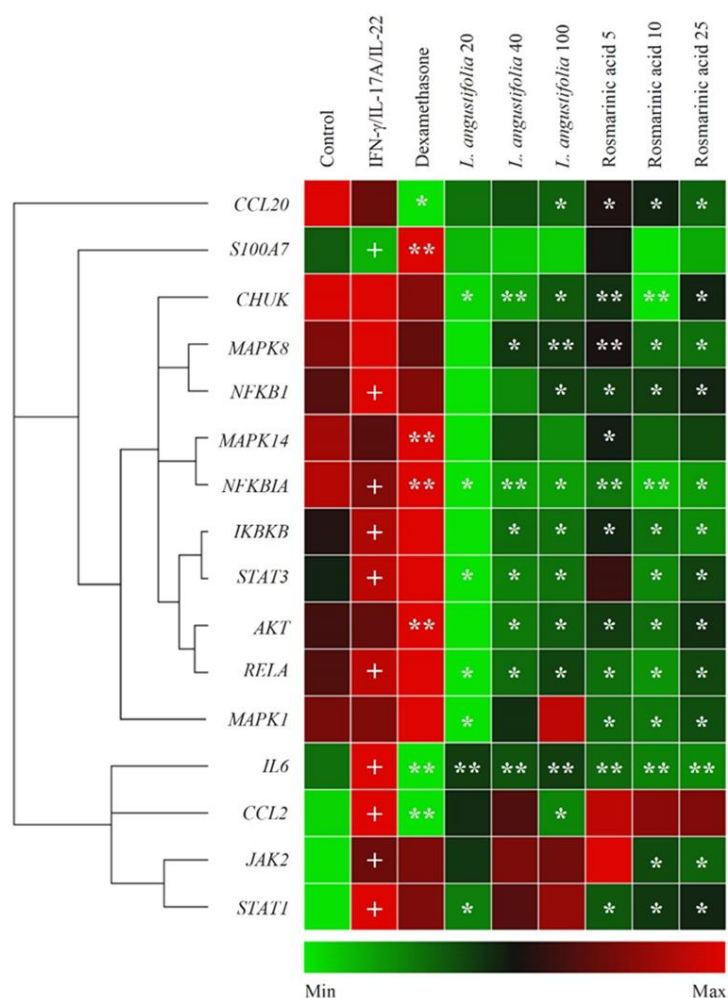
1.2.1. Определяне на нетоксични концентрации на третиране

Проведен е анализ за клетъчна жизнеспособност на HaCaT, за да се определи ефекта от третиране с различни концентрации на биотехнологично получения екстракт от *L. angustifolia* и RA. Експозицията, на която HaCaT са изложени в продължение на 24 часа, не доведе до значително повлияване на клетъчната жизнеспособност - съответно до 100 $\mu\text{g/mL}$ за екстракта и до 100 μM за RA (Фигура 6).



Фигура 6. Ефект на екстракт от клетъчна суспензия на *L. angustifolia* (А) и чиста розмаринова киселина (Б) върху клетъчната жизнест на човешки кератиноцити. Както *L. angustifolia*, така и RA не повлияват значително жизнестта на клетки HaCaT на 24-тия час от третиране. Представителни данни от три независими експеримента (средна стойност $\pm$ SEM; * $p < 0.05$ в сравнение с нетретираните контроли).

1.2.2. Екстрактът от *L. angustifolia* и розмариновата киселина намалят свързаните с псориазис възпалителни промени в профила на генната експресия в човешки кератиноцити. Взаимодействието между активирани имунни клетки и кератиноцити е определящ фактор за патологията на псориазис. Следователно възпалителните цитокини индуцират псориазисен фенотип в кератиноцити (Nestle et al., 2009; Yan et al., 2017; Yang et al., 2017; Zhang et al., 2018; Slivka et al., 2019). Стимулирането с комбинацията от възпалителни цитокини IFN- γ /IL-17A/IL-22 предизвиква промени в профила на експресия на информационна (и)РНК на човешки кератиноцити, които имитират подобен на псориазис транскрипционен подпис (Фигура 7).



Фигура 7. Екстрактът от *L. angustifolia* и розмариновата киселина понижено регулират експресията на свързани с възпалението гени в модел на псориазис в човешки кератиноцити. Клъстерграма и топлинна карта от анализ на относителната генна експресия с RT-qPCR. Резултатите са изразени като средна стойност $\pm$ SEM от три независими експеримента; + $p < 0.05$ в сравнение с контролните клетки; * $p < 0.05$ и ** $p < 0.01$ в сравнение с моделната група.

Хроничното възпаление, анормалната пролиферация и диференциацията на кератиноцитите са ключовите събития, свързани с развитието на псориазис (Girolomoni et al., 2017; Albanesi et al., 2018). Следователно инхибирането на възпалението на кератиноцитите може да бъде прилагано като ефективен терапевтичен подход при лечение на псориазис. Активираният кератиноцит реагира на имунната стимулация в опит да се противопоставят на псориазисните промени със секреция на хемоатрактантни молекули, като MCP1 и (C-C мотив лиганд) CCL20, възпалителни цитокини (IL-4, IL-6, IL-8) и S100A антибактериални пептиди (Wolk et al., 2006; Nograles et al., 2008; Andres et al., 2013; Greb et al., 2016; Lee et al., 2019; Liang et al., 2019). Въпреки това, индуцираните възпалителни фактори допълнително привличат имунни клетки при псориазисните лезии и влошават възпалителната среда (Wolf et al., 2010; Girolomoni et al., 2017; Albanesi et al., 2018; Itoh et al., 2019; Zhang et al., 2021c).

Излагането на кератиноцити на въздействието на комбинацията от цитокини IFN- γ /IL-17A/IL-22 представлява надежден модел на псориазисно възпаление *ин витро* (Kim et al., 2014; An et al., 2018; Kim et al., 2018; Shi et al., 2018; Zhang et al., 2018; Slivka et al., 2019; Li et al., 2020). Подобно на очакванията, стимулирането на кератиноцитите с IFN- γ /IL-17A/IL-22 в настоящото проучване доведе до високи стойности на експресия на възпалителните фактори IL-6 и CCL2 (кодиращ MCP1), което потвърждава индукция на псориазисното възпаление. Прилагането на екстракта от *L. angustifolia* дозозависимо променя посоката на повишеното регулиране на IL-6, CCL2 и CCL20. По същия начин третирането с RA в концентрации, съответни на установените в екстракта дози, понижи в още по-голяма степен експресията на IL-6 до нива, сравними с тези при третиране с DEXA.

Псориазисното състояние се характеризира с активиране на възпалителните сигнални пътища. Пътят ядрен фактор капа В (NF- κ B) е ключов регулаторен път по време на възпаление и се счита за решаващ медиатор в патогенезата на псориазиса (Andres et al., 2013; Kim et al., 2014; Zhang et al., 2018). В настоящото проучване са изследвани основни гени, отговорни за активирането на NF- κ B, а именно: CHUK, IKBKB, NFKBIA, NFKB1 и RELA. Стимулирането на клетки HaCaT с комбинацията от цитокини доведе до повишаване на тяхната експресия. Глюкокортикоидната терапия, прилагана често при псориазис, действа предимно през инхибиране именно на NF- κ B с цел да осъществи мощния си противовъзпалителен ефект (Bigas et al., 2018). Ето защо третиране с DEXA очаквано показва понижено регулиране на експресията на NF- κ B цели надолу по веригата като IL-6, CCL2 и CCL20. Третиране както с екстрактът от *L. angustifolia*, така и с RA понижено регулира всички изследвани гени на пътя NF- κ B. Освен това, инхибирането на тяхната експресия при

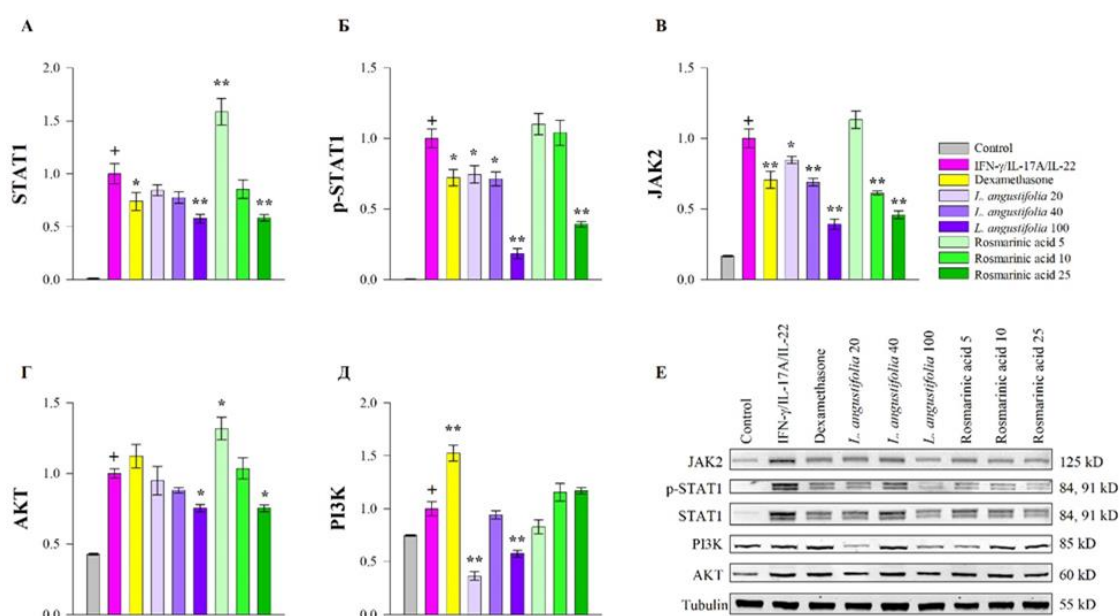
третиране с екстракта в най-високата концентрация (100 µg/mL), надвиши постигнатото такова с DEXA (5 µM). При третиране с RA също е регистрирано дозозависимо понижение, което е по-ефективно от постигнатото от DEXA, но не и от екстракта. Тези резултати насочват, че RA е само частично отговорна за постигнатото от екстракта от *L. angustifolia* инхибиране на свързаните с NF-κB гени.

Данните от йерархичния клъстерен анализ на относителната генна експресия, получени с RT-qPCR, показват значително регулиране и на свързани с Янус киназа (JAK)/сигнален преобразувател и активатор на транскрипция (STAT) гени (Shi et al., 2011; Sun et al., 2019; Li et al., 2020; Kim et al., 2021; Zhang et al., 2021a; Li et al., 2023), митоген-активирана протеин киназа (MAPK) p38/протеин киназа В (AKT) сигнални пътища, както и на провъзпалителни цитокини. В съгласие с предишни доклади, използващи подобна комбинаторна стимулация за моделиране на псориазис в кератиноцити, е открита свръхекспресия на гените *JAK2*, *STAT1* и *STAT3* (An et al., 2018; Li et al., 2020; Zhang et al., 2021a; Li et al., 2023). В настоящия експеримент увеличението при генната експресия на *STAT1* е около 10 пъти по-високо от свръхекспресията на *STAT3* при стимулиране с IFN-γ/IL-17A/IL-22, което сочи *STAT1* като по-силно повлиян в настоящия модел. Силното влияние на екстракта върху NF-κB гените предполага неговото мощно противовъзпалително действие в псориазисните кератиноцити. В подкрепа на това е фактът, че ключовите гени *STAT3*, *AKT* и *MAPK8* (кодиращ протеина JNK) са значително инхибирани при прилагане на екстракта от *L. angustifolia*. Това предполага, че екстрактът потиска съответните сигнални пътища JAK/STAT, MAPK и фосфатидилинозитол 3-киназа (PI3K)/AKT. Подобно на третирането с екстракта от *L. angustifolia*, генната експресия на *STAT3* и *AKT* също е повлияна от RA, но в по-малка степен. Освен това, експресията на гените *MAPK8* и *MAPK1* (кодиращ ERK1/2 протеин) е дозозависимо понижена в резултат на прилагането на RA. Интересно е също, че третирането с RA на стимулирани кератиноцити доведе до значително потискане на *JAK2* и *STAT1*, което не се наблюдава при прилагането на екстракта.

Всички тези резултати показват, че екстрактът от *L. angustifolia* засяга предимно гени от NF-κB сигнализирането в активирани кератиноцити, докато RA освен тях потиска и JAK/STAT сигнализирането. Резултатите от проведения с RT-qPCR анализ на генната експресия ясно демонстрират, че екстрактът от лавандула и RA значително и концентрационно зависимо потискат експресията на почти всички изследвани гени (провъзпалителни и/или характерни за псориазис). Поради това свързаното с псориазис възпаление в кератиноцити може да бъде потиснато чрез третиране с екстракт от *L. angustifolia* и RA.

1.2.3. Екстрактът от *L. angustifolia* и RA потискат сигнализирането JAK2/STAT1 в човешки кератиноцити

Данните от анализа с имуноблот сочат, че екстрактът от *L. angustifolia* и чистата RA нарушават JAK2/STAT1 сигнализирането в кератиноцити. Цитокини като IFN- γ , IL-17A или IL-22 се свързват с рецепторите на клетъчната повърхност и трансдукцията на сигнала се осъществява чрез JAKs, което от своя страна насърчава фосфорилирането и активирането на STAT1 и/или STAT3 при псориазис (Shi et al., 2011; Banerjee et al., 2017; Itoh et al., 2019; Sun et al., 2019; Zhang et al., 2021a; Li et al., 2023). При псориазисни лезии се откриват повишени нива на pSTAT1 (Antunes et al., 2011; Hald et al., 2013). Поради това, че в настоящото проучване в резултат на стимулиране с цитокини генната експресия на *STAT1* е активирана преимуществено над тази на *STAT3*, е оценена способността на RA да противодейства на активирането на STAT1 и на ниво протеин (Фигура 8).



Фигура 8. Екстрактът от *L. angustifolia* и чистата розмаринова киселина инхибират JAK2/STAT1 сигнализирането в HaCaT клетки. Експресия на протеин STAT1 (А), фосфорилиран STAT1 (Б), JAK2 (В), АКТ (Г) и PI3K (Д), нормализирана спрямо тубулин и представителни блотове от имуноблот анализа (Е). Представителни данни от три независими експеримента (средна стойност $\pm$ SEM; + $p < 0.05$ в сравнение с контролните клетки; * $p < 0.05$ и ** $p < 0.01$ в сравнение с моделната група).

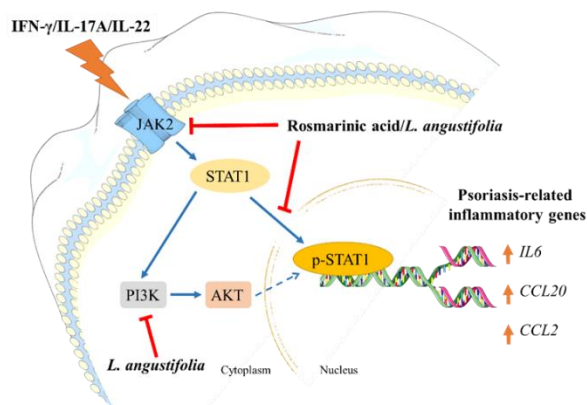
Имуноблот анализът (Фигура 8) показва, че инхибиторните ефекти както на екстракта, така и на RA върху общия STAT1 (Фигура 8А) и нивата на фосфорилиране на STAT1 (Фигура 8Б) в HaCaT са зависими от концентрациите на третиране. Освен това при най-

високата използвана концентрация, понижаването на нивата на STAT1 и pSTAT1 е по-голямо от постигнатото с DEXA. Също така екстрактът от лавандула и RA значително намаляват нивата на протеин JAK2 (Фигура 8B) по концентрационно зависим начин. Това предполага, че инхибирането на активирането на STAT1 се постига през подтискане на JAK2. Анализът с RT-qPCR показва, че транскрипционната активност на *JAK2* и *STAT1* е значително намалена от RA (Фигура 7), което съответства на наблюдаваните промени на ниво протеин. Получениите резултати демонстрират, че STAT1 се очертава като ключова цел както на екстракта от *L. angustifolia*, така и на основния му активен компонент RA, чрез която те упражняват своя противовъзпалителен ефект при псориаитични кератиноцити. В настоящото изследване са предоставени доказателства за това, че както екстрактът, така и RA ефективно възстановяват фосфорилирането на STAT1 до нива, надвишаващи тези на DEXA. Това предполага, че RA може да блокира сигнализирането на STAT1 в кератиноцитите.

Участието на сигнализирането на PI3K/AKT в клетъчната пролиферация е отличителен белег на псориазис по отношение на хиперкератинизацията (Engelman et al., 2006; Goldminz et al., 2013; Kim et al., 2018; Li et al., 2019b; Thatikonda et al., 2020). Данните от анализа на генната експресия разкриват, че както екстрактът от *L. angustifolia*, така и RA понижават AKT (Фигура 7) до степен, подобна на тази при третиране с DEXA. За да се изясни допълнително механизма, по който екстрактът и RA инхибират псориазиса в активирани кератиноцити, е изследван и сигналния път PI3K/AKT на ниво протеин. Третирането с техните най-високи концентрации, съответно 100 µg/mL за екстракта и 25 µM за RA доведе до намаляване нивото на протеин AKT (Фигура 8Г), докато PI3K (Фигура 8Д) е повлиян само от екстракта от *L. angustifolia*. На база горе изложеното се предполага, че взаимодействието на екстракта със сигнализирането на PI3K/AKT може да се дължи на фитохимичната сложност на екстракта. Модулирането на PI3K/AKT, наблюдавано при третиране с екстракта от *L. angustifolia*, заслужава по-задълбочено проучване, тъй като може да доведе до намалена пролиферация на псориаитичните кератиноцити и следователно да намали размера на лезията. Въз основа на получените резултати е предложен молекулярен механизъм на биологично действие на екстракта от *L. angustifolia* и чистата RA в *ин vitro* модел на псориазис (Фигура 9).

Тъй като при повечето лабораторни проучвания е доказано, че RA е относително безопасна за нормалните клетки (Domitrovic et al., 2014; Shang et al., 2016; Chen et al., 2018; Leu et al., 2019; Luo et al., 2020; Vasileva et al., 2021; Zhang et al., 2021a), получените в това изследване резултати предполагат, че RA може да се прилага като потенциална терапия за

борба с псориазис. Умерената бионаличност на RA при перорално приложение обикновено е недостатък за нейното използване при лекарствена терапия (Nunes et al., 2017; Shen et al., 2017; Luo et al., 2020). От друга страна е установено, че локалното приложение на RA е ефективно при модели на кожни заболявания, като модел на атопичен дерматит на мишки (Jang et al., 2011). Най-предпочитано антипсориатичните препарати се използват локално, така че RA и богатите на RA екстракти като екстракта от *L. angustifolia* могат успешно да се интегрират в продукти (угвенти, гелове, кремове) за лечение на псориазис.



Фигура 9. Схематично представяне на предложените механизми на действие на екстракт от *L. angustifolia* и розмаринова киселина при модел на подобно на псориазис възпаление в човешки кератиноцити. Клетките HaCaT, изложени на комбинацията от стимули IFN- γ /IL-17A/IL-22, реагират с активиране на JAK2/STAT1 и PI3K/AKT сигнални пътища. Активирането на JAK2 при цитокинова стимулация води до активиране на STAT1 и последващото му фосфорилиране. След ядрена транслокация фосфорилираният STAT1 индуцира транскрипционно активиране на свързани с псориазис възпалителни гени (*IL6*, *CCL20*, *CCL2*). Активираната ос PI3K/AKT в псориатичните кератиноцити корелира с индуциране на хиперпролиферация и влошаване на възпалителната среда. В настоящото изследване и RA, и екстрактът от *L. angustifolia* инхибират JAK2 и намаляват фосфорилирането на STAT1, предотвратявайки активиране на възпалителен процес. Освен това, екстрактът от *L. angustifolia* нарушава сигнализирането PI3K/AKT, което може да допринесе за намаляване на пролиферацията в активирани кератиноцити. Вzeti заедно, получените резултати предполагат инхибиторен ефект на екстракта от *L. angustifolia* и RA върху свързаното с псориазис възпаление в човешки кератиноцити.

В обобщение, получените резултати сочат, че биотехнологично произведеният екстракт от *L. angustifolia* намалява псориатичното възпаление в човешките кератиноцити чрез намеса в сигнализирането на JAK2/STAT1 и неговата ефективност се дължи на

съдържанието на RA. Освен това както екстрактът, така и RA регулират гените свързани с NF-κB. Също така става ясно, че екстрактът може да повлияе сигнализирането на PI3K/AKT, предполагайки потенциална модулация на пролиферацията на кератиноцити при псориазис (Фигура 8). Като цяло тези резултати предполагат, че биотехнологично произведеният екстракт от *L. angustifolia* или RA могат да намерят приложение като обещаващи терапевтични алтернативи при лечение на псориазис. Необходимо е допълнително *ин vivo* валидиране, за да се потвърди тяхната ефективност в псориазиатичната терапия.

2. Химично охарактеризиране и *ин vitro* определяне на антипсориазиатичния потенциал и механизъм на действие на биотехнологично получен екстракт от *H. procumbens*, вербаскозид и левкосептозид А

Изследвана е биологичната активност на екстракта от дяволски нокът и неговите фенилетаноиди VER и LEU в *ин vitro* модел на псориазис при човешки кератиноцити. Допълнително са изяснени основните молекулярни механизми на тяхното действие.

2.1. Фитохимично охарактеризиране на екстракт от *H. procumbens*

Постигнато е метаболитно профилиране на екстракта от дяволски нокът чрез ЯМР, като наред с VER и LEU са идентифицирани и първични метаболити (Таблица 3).

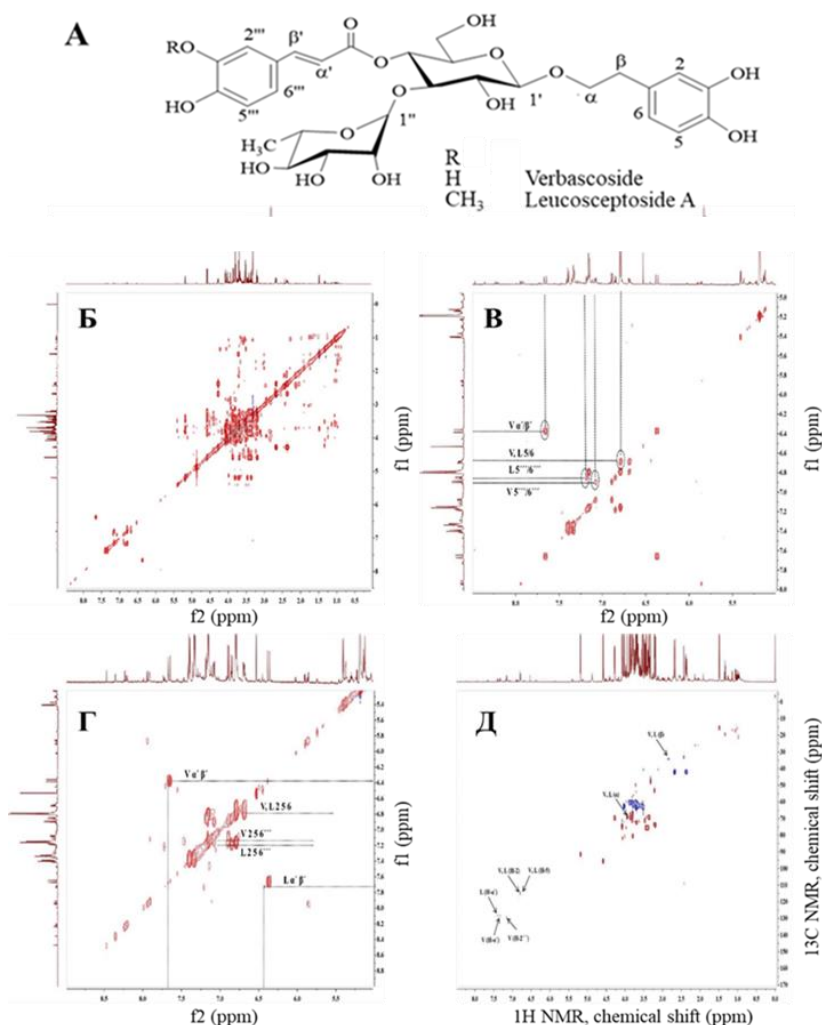
Таблица 3. Химично отместване (δ) и константа на сдвояване (J) на сигнали за протони в структурата на метаболитите, идентифицирани в екстракт от *H. procumbens* (дяволски нокът) чрез сравняване на получения ^1H ЯМР спектър с литературни данни (Georgiev et al., 2011; Santos-Cruz et al., 2012; Youssef et al., 2017; Burgos et al., 2020).

Метаболит	Химично отместване (ppm)	Константа на сдвояване (Hz)
α -Глюкоза	5.19	(d, $J = 3.8$)
β -Глюкоза	4.59	(d, $J = 7.9$)
Аланин	1.49	(d, $J = 7.2$)
Валин	1.01/1.06	(d, $J = 7.3$)/(d, $J = 7.1$)
Вербаскозид	1.06/2.84/4.08/3.97/4.49/5.13/ 6.37/6.69/6.79/6.80/6.89/7.08/ 7.16/7.66	(d, $J = 7.2$)/(m)/(m)/(m)/(d, $J = 7.9$)/(d, $J = 1.6$)/(d, $J = 16.0$)/(dd, $J = 8.1$; 2.0)/(d, $J = 8.6$)/(d, $J = 2.0$)/(d, $J = 8.3$)/(dd, $J =$

		8.4; 2.1)/(d, J = 2.0)/(d, J = 16.0)
Глутамин	2.14/2.38	(m)/(m)
Захароза	5.41	(d, J = 3.9)
Левкосептозид А	1.06/2.84/4.08/3.97/4.49/5.13/ 6.44/6.69/6.79/6.80/6.91/7.15/ 7.26/7.72	(d, J = 7.2)/(m)/(m)/(m)/(d, J = 7.9)/(d, J = 1.6)/(d, J = 16.2)/(dd, J = 8.1; 2.0)/(d, J = 8.6)/(d, J = 2.0)/(d, J = 8.4)/(dd, J = 8.2; 1.7)/(d, J = 2.0)/(d, J = 15.6)
Мравчена киселина	8.47	(s)
Оцетна киселина	1.92	(s)
Серин	3.94	(m)
Треонин	1.33	(d, J = 6.3)
Фруктоза	4.18	(d, J = 8.6)
Фумарова киселина	6.53	(s)
Холин	3.22	(s)
Янтарна киселина	2.44	(s)

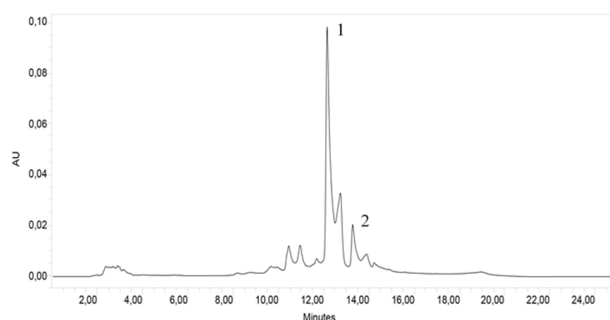
Посредством сравняване на данните от получените ЯМР спектри – ^1H и 2Д (COSY, HSQC и обща хомоядрена корелационна спектроскопия - TOCSY) с тези в литературата е потвърдено наличието на вторичните метаболити VER и LEU (Фигура 10). В ^1H ЯМР и HSQC спектрите на екстракта се наблюдават характерни за VER сигнали от две системи тип ABX: сигнали за H-2 (δ_{H} 6.80, d/ δ_{C} 118.52), H-5 (δ_{H} 6.79, d/ δ_{C} 118.11) и H-6 (δ_{H} 6.69, dd/ δ_{C} 124.19), съответстващи на 3,4-дихидрокси- β -фенилетоксилна част и сигнали за H-2''' (δ_{H} 7.16, d/ δ_{C} 117.17), H-5''' (δ_{H} 6.89, d/ δ_{C} 118.65) и H-6''' (δ_{H} 7.08, dd/ δ_{C} 121.90) за кафеоиловия остатък. Дублетите за двата *транс*-олефинови протона α' (δ_{H} 6.37, d/ δ_{C} 112.80) и β' (δ_{H} 7.66, d/ δ_{C} 146.7) всеки с $J = 16.0$ Hz, доказват наличието на двойна връзка с *E*-конфигурация в кафеената киселина. В допълнение, дизахаридната структура е идентифицирана чрез наличието на сигнали за двата аномерни протона H-1' (δ_{H} 4.49, d/ δ_{C} 105.57) и H-1'' (δ_{H} 5.13, s/ δ_{C} 104.41), съответстващи за β -глюкоза и α -рамноза (Burgos et al., 2020; Santos-Cruz et al., 2012). Химичните отмествания на сигналите за LEU са сходни с тези на VER, с изключение на това, че в ^1H и ^{13}C спектри на изолирания от екстракта LEU се наблюдават допълнителни

сигнали, съответно при δ_H 3.90 (3H, s) и δ_C 60.19, отговарящи за наличието на метокси група. Сравнението на данните с тези в литературата определи, че ацилната част е ферулова киселина (Youssef et al., 2017). Наличието на двете съединения в екстракта е потвърдено от характерните корелации, наблюдавани в 1H - 1H COSY, TOCSY и HSQC спектрите (Фигура 10).



Фигура 10. Химическа структура на вербаскозид и левкосептозид А (А); ЯМР спектри на екстракт от клетъчна суспензия от *H. procumbens*: обща корелационна спектроскопия (1H - 1H TOCSY; Б), ароматна част от спектъра (В); хомоядрена корелационна спектроскопия (1H - 1H COSY; Г) и хетероядрена корелационна спектроскопия 1H - ^{13}C HSQC (Д).

В настоящото проучване е получен 3.68 g сух екстракт от 10.04 g суха биомаса от клетъчна суспензия на дяволски нокът. Определеното съдържание на VER и LEU чрез BETX (Фигура 11) е приблизително 4% и 1% (Таблица 4).



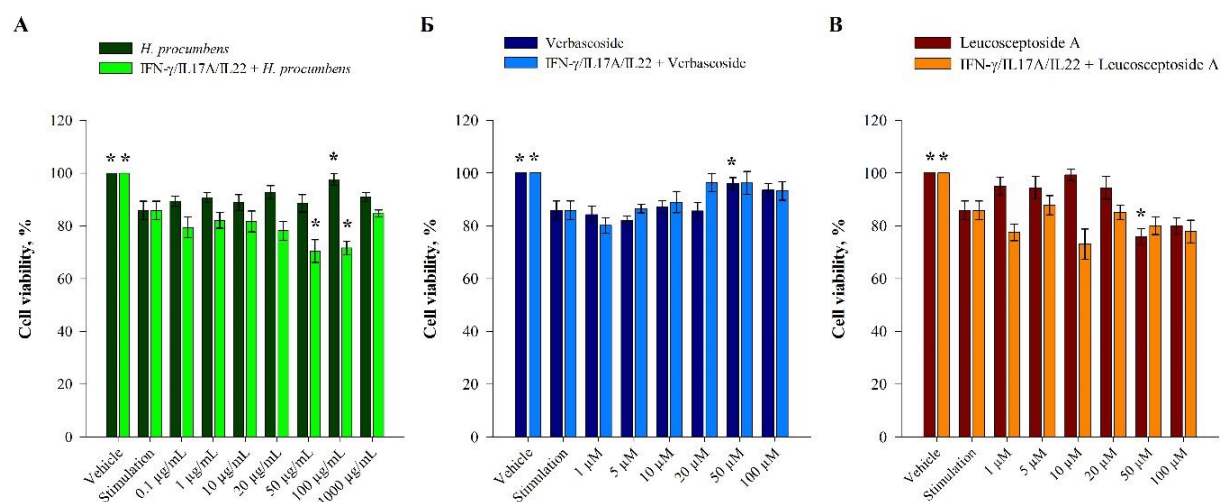
Фигура 11. ВЕТХ хроматограма на екстракт от клетъчна суспензия на *H. procumbens*.
Пикове: 1, вербаскозид VER; 2, левкосептозид А.

Таблица 4. Съдържание на фенилетаноидни гликозиди в екстракт от клетъчна суспензия на *H. procumbens* (НР), определени чрез ВЕТХ.

Метаболит	Време на задържане, (min)	Съдържание, (mg/g) Биомаса от НР	Екстракт от НР
Вербаскозид	12.132	10.94 ± 1.18	3.99 ± 0.49
Левкосептозид А	13.257	1.64 ± 0.16	0.60 ± 0.07

2.2. *Ин витро* оценка на противовъзпалителна активност на *H. procumbens*, вербаскозид и левкосептозид А при човешки кератиноцити

За определяне на нетоксичните концентрации на третиране е изследвана клетъчната жизнеспособност на кератиноцитни HaCaT (Фигура 12).

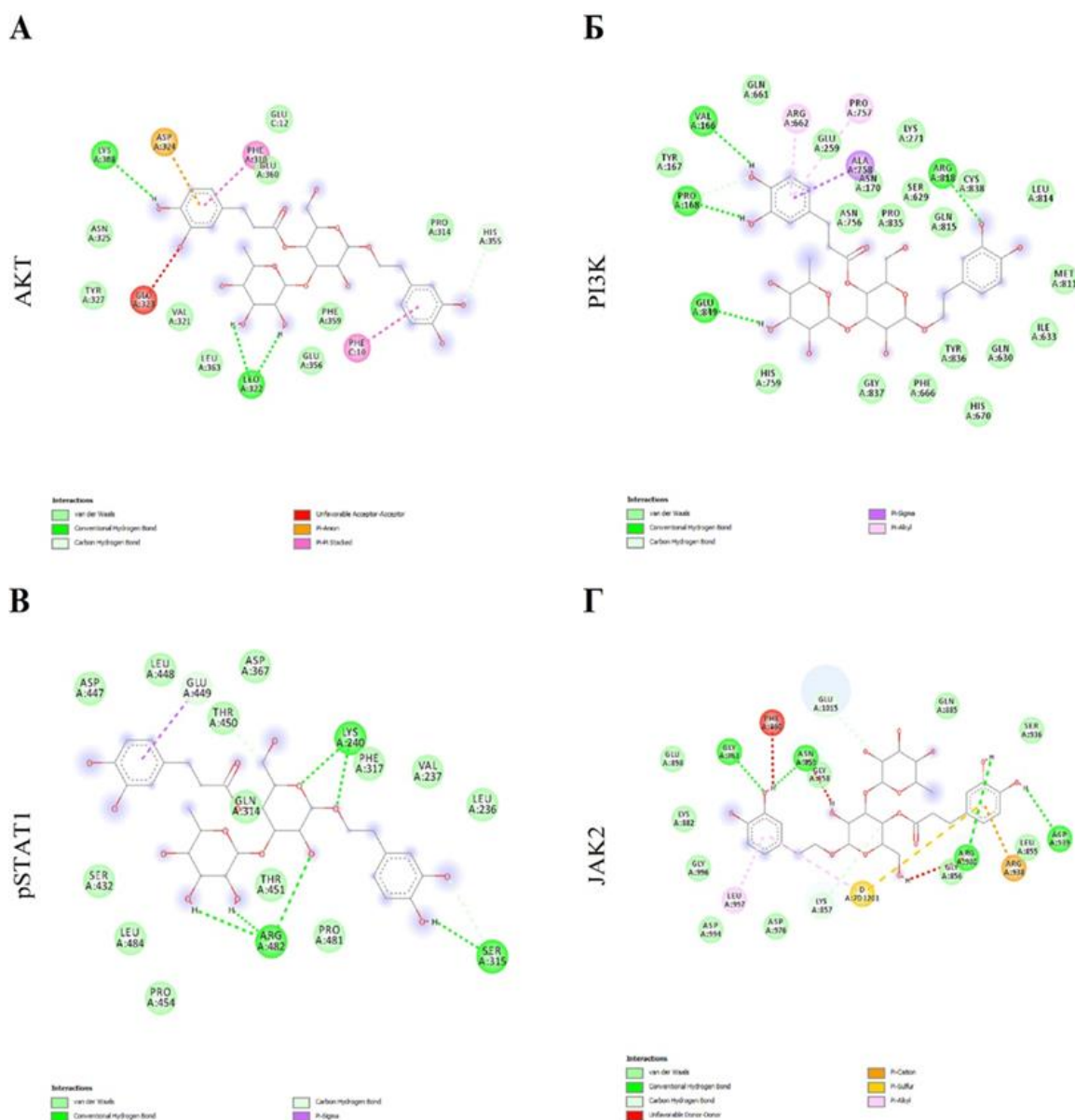


Фигура 12. Ефект на екстракт от клетъчна суспензия на *H. procumbens* (Burch) DC ex Meisn (A), чист вербаскозид (B) и чист левкосептозид А (C) върху клетъчната жизнеспособност на човешки кератиноцити. Представителни данни от три независими експеримента (средна стойност ± SEM; * $p < 0.05$ в сравнение с нетретираните контроли).

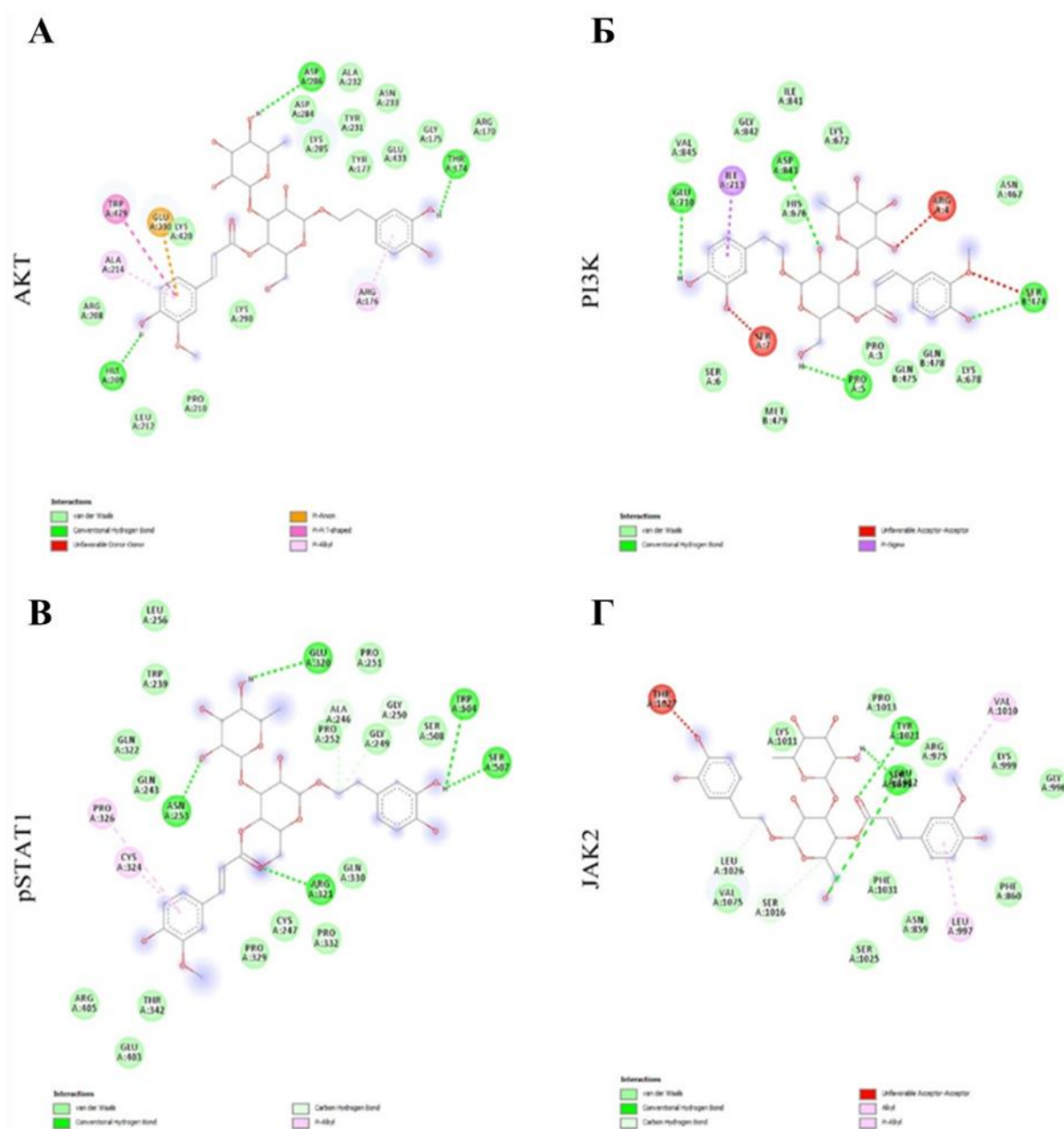
Въздействието на екстракта, VER и LEU за 24 часа не доведе до значително повлияване на клетъчната жизнеспособност на HaCaT, съответно до 100 µg/mL за екстракта и до 100 µM за индивидуалните чисти съединения.

2.2.1. Определяне на потенциала на взаимодействие между изследваните природни съединения и избрани протеинови структури

За да се предскажат предполагаемите афинитети на свързване между VER и LEU със характерни за псориазис протеини AKT; PI3K; pSTAT1 и JAK2 е използван подходът на молекулярния докинг анализ (Фигури 13 и 14).



Фигура 13. Предполагаме взаимодействия между вербаскозид (VER) и AKT (А); VER и PI3K (Б); VER и pSTAT1 (В); VER и JAK2 (Г).



Фигура 14. Предполагаеми молекулярни взаимодействия между левкосептозид А (LEU) и AKT (А); LEU и PI3K (Б); LEU и pSTAT1 (В); LEU и JAK2 (Г).

Предсказването на взаимодействието между нискомолекулни съединения и определени протеини може да бъде осъществено чрез докинг изчисления, които подпомагат разкриването на техния молекулярен механизъм на действие и предполагат директни взаимодействия (включително Ван дер Ваалсови, водородни и пи връзки) между изследваните структури и таргетните протеини (Jin et al., 2016). Взаимодействията на изследваните съединения с гореспоменатите протеини са изразени като свързваща свободна енергия (ΔG) и константа на афинитетно свързване (K_i ; Таблица 5).

Получените теоретично изчислени стойности на ΔG и K_i предполагат, че посочените протеини са сред основните прицелни мишени на двете съединения. Посочен е предполагаем субмикромоларен афинитет (0.1-5.4 μM), като ниските стойности на K_i предполагат по-голяма вероятност на взаимодействие.

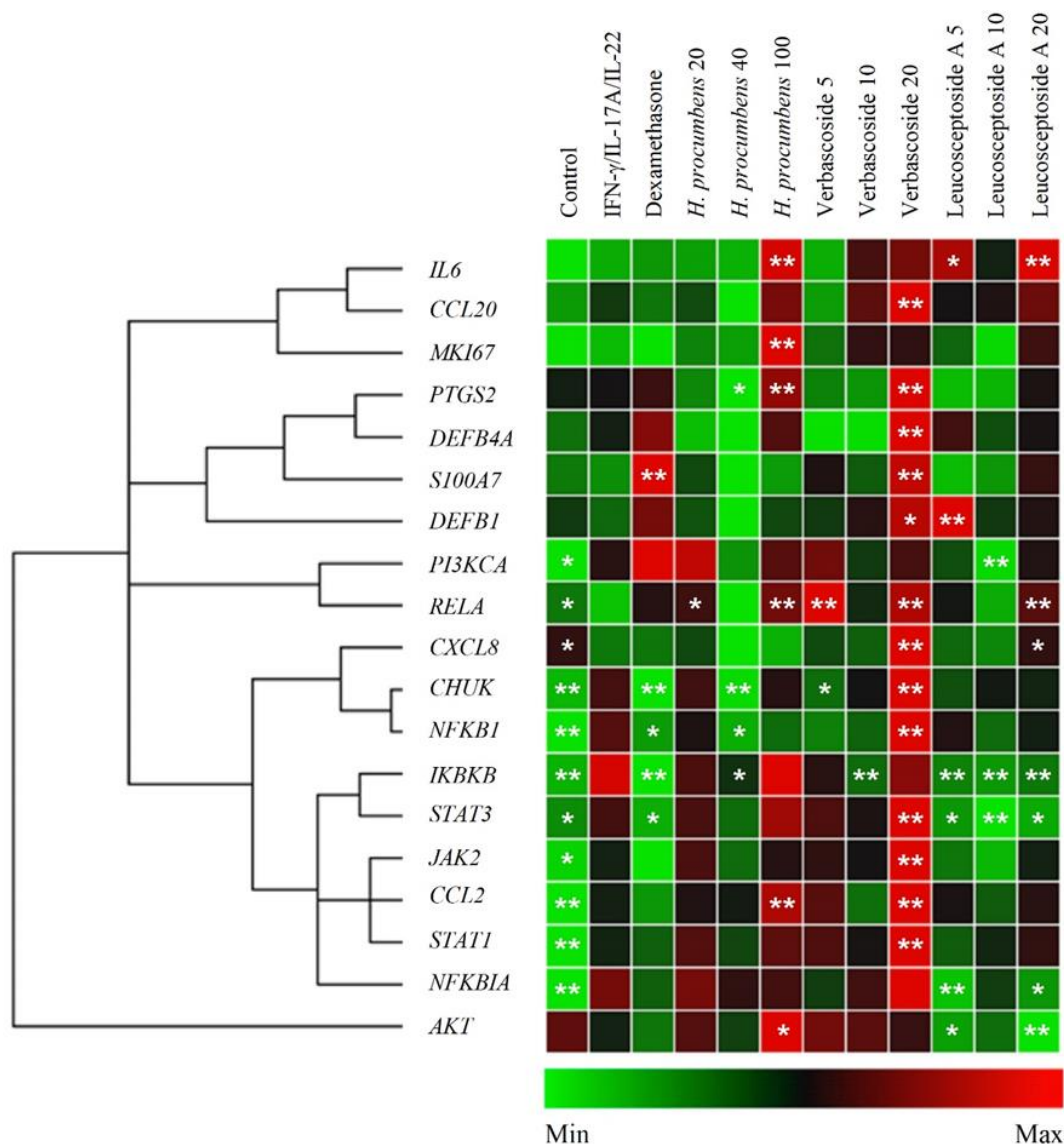
Таблица 5. Свободна енергия на свързване (ΔG , kcal/M) и афинитетна константа (K_i , μM) за всеки компонент към протеиновата структура.

Таргетен протеин	Вербаскозид		Левкосептозид А	
	ΔG (kcal/M)	K_i (μM)	ΔG (kcal/M)	K_i (μM)
AKT	-7.5	3.20	-7.2	5.40
PI3K	-9.7	0.08	-8.8	0.40
pSTAT1	-8.5	0.60	-8.2	1.00
JAK2	-7.5	3.20	-7.2	5.40

2.2.2. Екстрактът от дяволски нокът и неговите съединения вербаскозид и левкосептозид А модулират профила на генна експресия в стимулирани с IFN- γ /IL-17A/IL-22 кератиноцити. Възпалението играе съществена роля в развиване на псориазиса и следователно възпалението на кератиноцитите е негов отличителен белег (Andres et al., 2013; Yang et al., 2020). Съобщава се, че транскрипционният фактор NF- κB е замесен в индуцирането на псориазис (Andres et al., 2013; Goldminz et al., 2013; Tsoi et al., 2017; Bian et al., 2020). Възпалителният отговор, активирането на NF- κB и производството на провъзпалителни медиатори – IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , (C-X-C мотив лиганд) CXCL8, CCL2 са силно свързани с патогенезата на заболяването (Goldminz et al., 2013). Комплексното сигнализиране на NF- κB се състои от p50, p52, RelA (p65), RelB и c-Rel субединици, които са изолирани в неактивна форма в цитоплазмата и се свързват с членовете на инхибиторна единица на NF- κB (I κ B). Възпалителната стимулация фосфорилира и разгражда I κ B чрез комплекса киназа I κ B (IKK), което води до освобождаване и ядрена транслокация на субединицата p65. Това от своя страна активира каноничния път на NF- κB . Активирането на p65 задейства секрецията на IL-8 и CCL20 и усложнява възпалителния отговор (Yang et al., 2020).

Резултатите от RT-qPCR анализа на експресията на провъзпалителни и ключови за псориазис гени показват, че екстрактът от дяволски нокът и неговите вторични метаболити VER и LEU участват в регулацията на профила на генна експресия на стимулирани с IFN- γ /IL-17A/IL-22 кератиноцити (Фигура 15). Третирането с екстракта от дяволски нокът и VER

повишава експресията на *IL8*, *PTGS2* и *CCL2*, *CCL20* посредством активиране на NF-κB, предполагайки засилване на имунния отговор и усложняване на подобната на псориазис възпалителна среда от прилагането на екстракта и това на VER. За разлика от това LEU не е въввлечен в такава регулация. Инхибирането на NF-κB и редуцирането на свързаните с него цитокини, регулирани надолу по веригата, е доказано като механизъм на действие за противовъзпалителни и антипсориазични ефекти на редица екстракти, фракции или чисти съединения *ин витро* и *ин vivo* (Kim et al., 2018; Balkrishna et al., 2019; Guo et al., 2021).



Фигура 15. Клъстерграма и топлинна карта на относителна генна експресия от RT-qPCR анализ. Екстрактът от *H. procumbens* (дяволски нокът) и чистият левкоскептозид А балансират експресията на гени, свързани с възпалението в *ин витро* модел на псориазис. Представителни данни от три независими експеримента (средна стойност ± SEM; * $p < 0.05$ и ** $p < 0.01$ в сравнение с моделната група на псориазис).

В този контекст резултатите разкриват, че екстрактът от дяволски нокът и неговия метаболит VER демонстрират стимулиращи ефекти в настоящия модел, насърчавайки производството на провъзпалителни медиатори и пролиферацията на кератиноцитите чрез активиране на NF-κB. Тези констатации подкрепят хипотезата, че активността на екстракта се дължи на съдържанието на VER. Освен това, третирането с VER води до повишено иРНК ниво на маркерите за псориазис (*CCL20*, *S100A7*, *DEFB1*, *DEFB4A*). В този случай, поради механизма на активиране на NF-κB и положителната експресия на *CCL20* наред с други, прилагането на VER може да усилва свързаното с псориазис възпаление. Същевременно *CCL20* и сигнализирането на NF-κB не са повлияни от третирането с LEU.

Третирането с биотехнологично произведения екстракт от дяволски нокът в концентрация 40 μg/mL инхибира гените от сигнализирането на NF-κB (*CHUK*, *IKBKB* и *NFKB1*) на ниво иРНК. Това е съпроводено с повишаване на относителната генна експресия на *RELA* и *NFKBIA*. Вzeti заедно, тези резултати показват активиране на сигналния път NF-κB и съответстват на положителната регулация на експресията на *CCL2*, *IL6* и *PTGS2* (кодиращ циклооксигеназа-2). Интересно е, че екстрактът от дяволски нокът демонстрира регулиране на иРНК експресията на *PTGS2* в двете посоки. В резултат от третиране с неговата междинна концентрация (40 μg/mL), експресията на *PTGS2* е понижена, докато при третиране с най-високо използваната концентрация (100 μg/mL), тя е значително увеличена. Същевременно, екстрактът от дяволски нокът в най-високата си концентрация също повишава експресиите на *MKI67* и *AKT*. Тази регулация не е наблюдавана при прилагане на LEU. Следователно се предполага, че активирането на NF-κB от екстракта от *H. procumbens* се дължи на съдържанието на VER или на съдържанието на общи феноли.

Интересно е, че изследваните индивидуални чисти съединения VER и LEU, които имат сходни химични структури (Фигура 10А), проявяват различна биологична активност в псориазисните кератиноцити. При третиране с VER в неговата най-висока концентрация (20 μM) е наблюдавано рязко индуциране на иРНК нивата на почти всички изследвани гени *CCL2*, *CCL20*, *IL8*, *PTGS2*, *S100A7*, бета дефензин (*DEFB1*, *DEFB4A*, *CHUK*, *RELA*, *NFKB1*, *JAK2*, *STAT1* и *STAT3*). Доказано е, че VER притежава противовъзпалителни свойства и инхибира сигнализирането на NF-κB в различни тъкани (Georgiev et al., 2010; Gyurkovska et al., 2011). Въпреки това, в настоящата моделна система той предизвиква по-скоро провъзпалителен ефект в псориазисните кератиноцити. Другият фенилетаноиден гликозид - LEU потиска иРНК експресията на *IKBKB* и *NFKBIA* и повиши генната експресия на *RELA* в най-високата си концентрация на третиране (20 μM). Следователно можем да предположим, че LEU по-скоро модулира NF-κB сигналния път.

Сигнализирането на JAK/STAT е друг транскрипционен път, който участва при възпалителни и имунно-медиирани нарушения (ревматоиден артрит, псориазис и възпалително заболяване на червата), и осъществява сигнална трансдукция надолу по веригата от критични за патогенезата на псориазис цитокини (Schwartz et al., 2017; Nogueira et al., 2020). Активирането на JAK/STAT е характерно и силно изразено при болестта псориазис (Banerjee et al., 2017; Schwartz et al., 2017; Nogueira et al., 2020). Противовъзпалителна активност, постигната чрез инхибиране на сигнализирането на NF-κB и JAK/STAT, е съобщена както *ин витро*, така и *ин vivo* (Kim et al., 2014; Kim et al., 2018; Sun et al., 2019; Bian et al., 2020; Li et al., 2020). По аналогичен начин в настоящите експериментални данни експресията на протеин JAK2 е повишено регулирана, докато фосфорилирането на STAT1 не е повлияно от третирането с екстракта от дяволски нокът, VER и LEU в стимулираните с IFN-γ/IL-17A/IL-22 кератиноцити. Тези открития предполагат, че изследваните екстракт и индивидуалното чисто съединение VER демонстрират провъзпалителна активност в настоящия модел на псориазис.

В резултат от стимулиране на кератиноцити HaCaT с IFN-γ/IL-17A/IL-22 е наблюдавана е свръхекспресия на гените *CHUK*, *IKBKB*, *NFKBIA*, *NFKB1*, *JAK2*, *STAT1* и *STAT3* като свързани с възпалението фактори в моделната група. Тези повишени нива на експресия са в съгласие с предишни проучвания, които използват подобен индуциран с IFN-γ/IL-17A/IL-22 модел на псориазис в кератиноцити (Nogales et al., 2008; Albanesi et al., 2018; Li et al., 2020). Установено е, че IL-17A повишено регулира кератин 17 (силно експресиран в псориаитичните лезии) чрез механизми, зависими от STAT1 и STAT3 (Shi et al., 2011). Известно е, че STAT1, STAT3 и NF-κB играят ключова роля в транскриптомната мрежа, замесена в механизма на псориазис (Sun et al., 2019; Luo et al., 2021). В лезии на псориаитична кожа е открита зависима от IFN-γ положителна транскрипционна регулация на експресията на приблизително 400 гена и преобладаващо регулиране на *STAT1* (Albanesi et al., 2018). Подобно на докладваните по-горе данни (от експеримента с третиране с екстракт от *L. angustifolia* и RA) при стимулиране с IFN-γ/IL-17A/IL-22, *STAT1* е повлиян в по-голяма степен, отколкото *STAT3* в настоящия псориаитичен модел (разликата в експресиите е над 10 пъти). В настоящия експеримент генната експресия на *STAT3* е концентрационно-зависимо инхибирана от третиране с LEU.

Същевременно, наред с пътя на предаване на сигнала JAK/STAT, сигналният път PI3K/AKT/механистична мишена на рапамицин (mTOR) също участва в развиването и прогресията на заболяването псориазис (Goldminz et al., 2013; Kim et al., 2014; Kim et al., 2018; Li et al., 2020; Thatikonda et al., 2020). Известно е, че активирането на PI3K/AKT/mTOR

и сигнализирането на STAT3 стимулират акантозата, която е замесена в имунопатогенезата на псориазиса (Madonna et al., 2012; Buerger et al., 2018). Хроничната епидермална хиперплазия при псориазисната лезия се дължи на пролиферацията на кератиноцити и основните събития на имунния отговор, изразени чрез свръхактивация на PI3K/AKT/mTOR и сигнализиране на STAT3 (Gangadevi et al., 2021; Lu et al., 2021). Инактивирането на пътища PI3K и AKT е намалило пролиферативните ефекти в псориазисни кератиноцити и е подобрило подобните на псориазис патологии *ин витро* и *ин vivo* (Banerjee et al., 2017; Li et al., 2019b; Xie et al., 2021b). Изследване на Thatikonda и сътр. (2020) докладва понижаване на маркера за пролиферация Ki67 чрез инхибиране на сигнализирането на AKT. Настоящото изследване потвърждава, че стимулирането на HaCaT клетки с IFN- γ /IL-17A/IL-22 предизвиква повишено регулиране на свързаните с PI3K/AKT гени и Ki67, който е един от важните маркери за хиперпролиферация в псориазисната кожа.

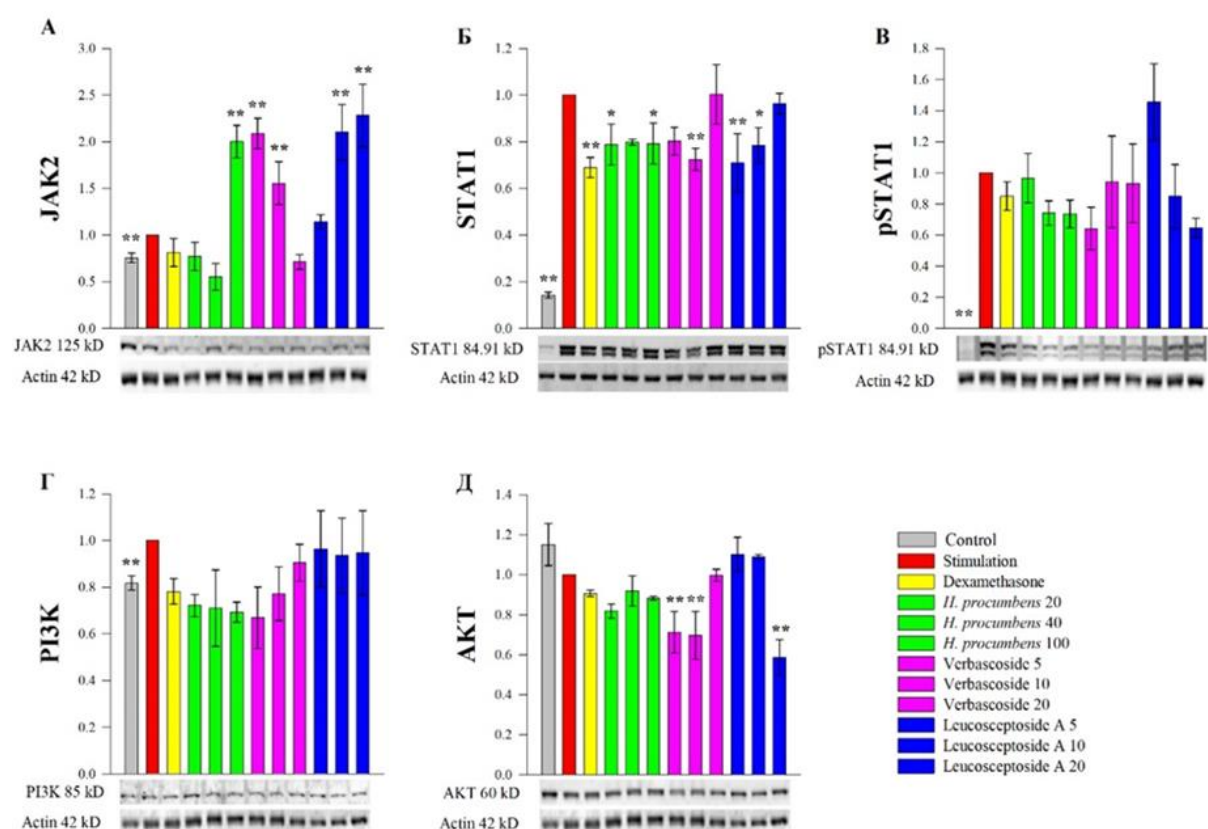
Генната експресия на *PI3KCA* е намалена в резултат от третирането с LEU, докато тази на *AKT* е понижена както от VER, така и от LEU. Следователно може да се предположи, че инхибирането на сигнализирането на AKT, наблюдавано при третиране с VER и LEU, може да доведе до регулиране на пролиферацията на активирани клетки HaCaT. Настоящите резултати обаче показват, че третирането с VER и LEU не повлияват експресията на маркера за пролиферация Ki67, запазвайки нивата му, сравнено с тези на контролната група. Въпреки това, са необходими допълнителни експерименти за идентифициране на точното целево място на AKT.

Взети заедно тези резултати показват, че екстрактът от дяволски нокът регулира предимно свързани с NF- κ B гени и тяхното активиране индуцира имунен отговор, и по този начин може да възпрепятства хиперпролиферацията на кератиноцитите. Съединението VER повлиява гени както от NF- κ B, така и от JAK/STAT сигнални пътища. В допълнение, екстрактът от дяволски нокът активира иРНК експресията на *AKT*, докато LEU потиска тези на *STAT3*, *PI3KCA* и *AKT* в стимулираните кератиноцити. Резултатите показват, че LEU повлиява кератиноцитите чрез потискане на сигнализирането на PI3K/AKT. Освен това, инхибирането на свръхактивираната генна експресия на *AKT* предполага, че LEU може да модулира програмата за диференциация на кератиноцитите при псориазис.

2.2.3. Ефект на екстракт от *H. procumbens* върху експресията на ключови за псориазис протеини

За изясняване на основните молекулярни механизми на действие на екстракта от дяволски нокът, VER и LEU, и за да се допълнят данните от RT-qPCR анализа, са изследвани

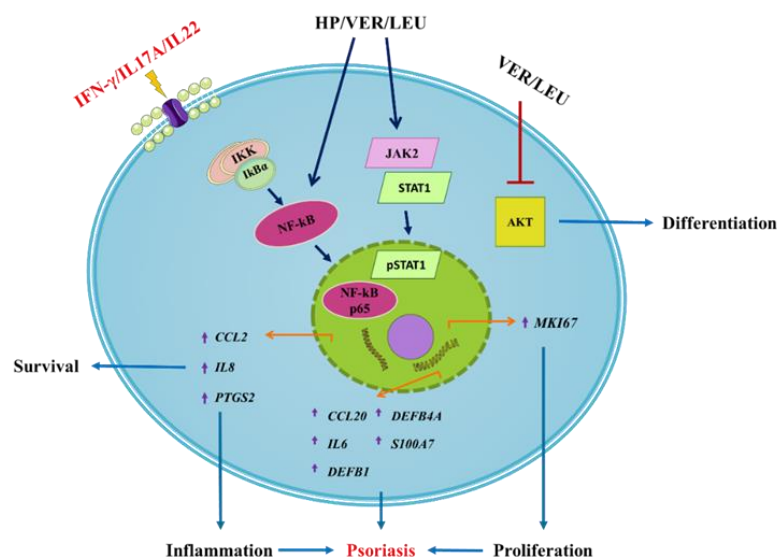
протеините на транскрипционни фактори, участващи в патогенезата на псориазис посредством имуноблот анализ. Резултатите от настоящия експеримент разкриват, че на ниво протеин JAK2, STAT1 и PI3K са активирани, докато AKT не е индуциран в моделната група на псориазис. Данните от анализа с имуноблот (Фигура 16) посочват намалено ниво на общия протеин STAT1 под влияние на екстракта от дяволски нокът, VER и LEU (Фигура 16Б), докато това на pSTAT1 е умерено засегнато от третирането с LEU (Фигура 16Б). В сравнение с резултатите, получени от RT-qPCR анализа (Фигура 15), нивото на генна експресия на STAT1 не е повлияно, както от третирането с екстракта от дяволски нокът, така и от това с фенилетаноидните гликозиди. Освен това, оценката на експресията на протеин JAK2 (Фигура 16А) демонстрира, че екстрактът (100 µg/mL), LEU (10, 20 µM) и VER (5, 10 µM) увеличават нивата на неговата експресия. Третирането с LEU не повлиява активирането на JAK2.



Фигура 16. Ефект на екстракта от *H. procumbens* и индивидуалните чистите съединения вербаскозид и левкосептозид А върху ключови протеини, свързани с псориазис. Експресия на протеини JAK2 (А), STAT1 (Б), фосфорилиран STAT1 (В), PI3K (Г) и АКТ (Д), получена от имуноблот анализ, нормализирана спрямо β-актин. Представителни данни от три независими експеримента (средна стойност ± SEM; * $p < 0.05$ и ** $p < 0.01$ в сравнение с моделната група на псориазис).

Силно активният път PI3K/AKT/mTORC1 може да доведе до аномална диференциация на кератиноцити, която е общопризната като основна патологична характеристика на псориазис (Chamcheu et al., 2016; Buerger et al., 2018; Lu et al., 2021). Инактивирането на сигнализирането на PI3K/AKT осигурява нов подход за лечение/управление на псориазис (Zhang et al., 2021b). Класическият път PI3K/AKT води до активиране на вътреклетъчното сигнализиране, което регулира клетъчния метаболизъм, растеж, пролиферация, диференциация и миграция (Engelman et al., 2006; Thatikonda et al., 2020; Teng et al., 2021). Нарушената регулация на пътя PI3K/AKT/ mTOR е свързана с кожни заболявания, акне и псориазис. PI3K се свързва с AKT и на свой ред активира mTOR, който насърчава хиперпролиферацията на кератиноцити и инхибира тяхната диференциация (Teng et al., 2021). Получените резултати показват, че нивото на протеин PI3K не е повлияно от третирането с екстракта от дяволски нокът, VER или LEU (Фигура 16Г), докато AKT е инхибиран от VER (5 и 10 μM) и LEU (20 μM) в стимулираните клетки HaCaT (Фигура 16Д). Тези данни потвърждават инхибиращ ефект върху сигнализирането на AKT на съединенията (особено на LEU, т.к. понижава и генната експресия), което предполага възможно независимо от PI3K взаимодействие.

В обобщение е предложен молекулярен механизъм на биологично действие на екстракта от дяволски нокът, VER и LEU в кератиноцити (Фигура 17).



Фигура 17. Предложен механизъм на действие на екстракт от *H. procumbens* (HP), индивидуални чисти съединения вербаскозид (VER) и левкоскептозид А (LEU) върху транскрипционната регулация на гени, свързани с възпаление и псориазис в стимулирани с IFN-γ/IL-17A/IL-22 кератиноцити. Изложените на комбинацията от провъзпалителни цитокини клетки HaCaT реагират с активиране на сигнални пътища NF-

κB, JAK2/STAT1 и PI3K/АКТ. Активирането на JAK2 под въздействие на цитокиновата стимулация води до активиране на STAT1 и последващото му фосфорилиране. Следвайки активиране и ядрена транслокация на NF-κB, се индуцира фосфорилираното транскрипционно активиране на STAT1, на свързани с псориазис гени на възпаление в активираните кератиноцити (напр. *IL6*, *IL8*, *CCL20*, *CCL2*, *PTGS2*, *DEFB1*, *DEFB4A* и *S100A7*). Едновременно с това активирането на оста PI3K/АКТ в псориазисните кератиноцити корелира с индуциране на хиперпролиферация, нарушена диференциация и влошаване на възпалителната среда. Фенилетаноидните гликозиди VER и LEU пречат на свързаното с псориазис възпаление чрез потискане на сигнализирането на АКТ.

Изненадващо, резултатите демонстрират, че екстрактът от дяволски нокът и VER са демонстрирали по-скоро стимулиращи отколкото противовъзпалителни ефекти в човешки кератиноцити чрез активиране на сигнализирането на NF-κB и JAK2/STAT1. Освен това се наблюдава, че VER и LEU могат да инхибират сигнализирането на АКТ, което предполага потенциална модулация на пролиферацията и диференциацията на кератиноцитите при псориазис. Вzeti заедно тези наблюдения показват, че биотехнологично произведеният екстракт от дяволски нокът и фенилетаноидните съединения VER и LEU влияят върху сигналния път JAK2/STAT1 в псориазисни кератиноцити. Освен това, на ниво протеин VER и LEU могат да попречат на сигнализирането на PI3K/АКТ.

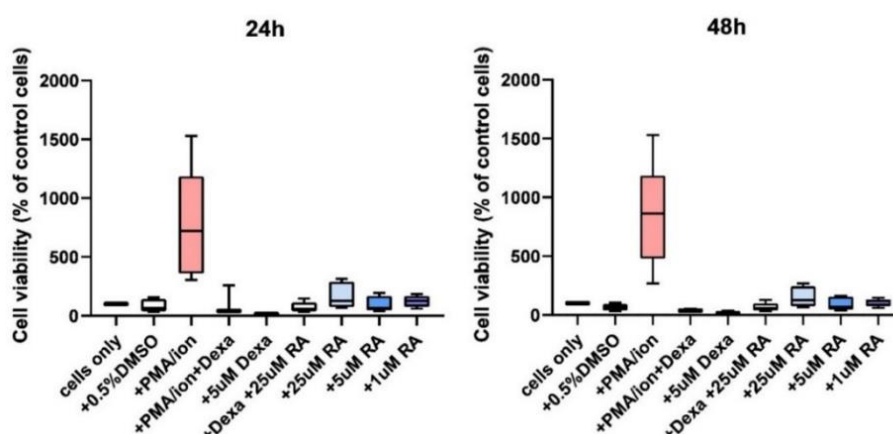
3. *Ин vivo* валидиране на противовъзпалителния ефект на розмаринова киселина

Въпреки наличието на различни терапии на псориазис, техните ограничения и нежелани ефекти продължават да представляват значително предизвикателство (Zhang et al., 2021c; Zhong et al., 2022; Carmona-Rocha et al., 2024; Ferrara et al., 2024). Следователно разработването на иновативни терапевтични стратегии е от съществено значение (Zhang et al., 2021c; Zhong et al., 2022). В този контекст, природните продукти се очертават като обещаващи източници на биологично-активни съединения с потенциални антипсориазисни свойства (Dabholkar et al., 2020; Pinto et al., 2020; Griffiths et al., 2021; Nguyen et al., 2022; Ramanunni et al., 2022; Zhong et al., 2022). Освен това, природните съединения все повече се разглеждат като полезни и безопасни адювантни терапевтични опции за облекчаване на симптомите на псориазис и са със значителен потенциал за интегриране в лекарствени продукти (Burlec et al., 2024). Повече от 50% от пациентите с псориазис, получаващи конвенционална терапия, използват допълнителни билкови и алтернативни продукти за намаляване на нежеланите реакции и облекчаване на псориазисните кожни раздразнения

(Dabholkar et al., 2020; Du et al., 2022). Експерименталният подход, който е използван в настоящият дисертационен труд за определяне на *ин vivo* анти-псориатичния потенциал на RA, включва животински модел на предизвикан с IMQ псориазиформен дерматит при мишки. Локалното приложение на 5% IMQ - лиганд на Toll-подобни рецептори 7/8 предизвиква подобен на псориазис дерматит с характерните за псориатичното възпаление кожни прояви, които много наподобяват тези на плаковиден тип псориазис при хора (Lin et al., 2016; Gangwar et al., 2022). Ефектът от локалното приложение на крем с RA е определен посредством оценка PASI и хистологичен анализ на кожни проби.

3.1. Ефект на RA върху преживяемостта на изолирани от слезка миши Т-клетки

Псориазисът все повече се признава като кожно заболяване, характеризиращо се с нарушена регулация на имунната система. Патогенезата му включва нарушена комуникация между вродения и придобит имунен отговор, което допълнително се влошава от системно възпаление (Albanesi et al., 2018; Zhang et al., 2021c). Различни видове имунни клетки с аномално активиране и взаимодействия играят критична роля в патогенезата на псориазис. Т-лимфоцитите са отговорни за натрупване в епидермиса на цитокини и хемокини, които насърчават пролиферацията на епидермалните кератиноцити (Girolomoni et al., 2017; Albanesi et al., 2018). В допълнение, привличането и активирането на неутрофили от макрофагите допринася за диференциацията и активирането на Т-клетките, което допълнително влошава възпалителната среда (Singhet al., 2024). Във връзка с това, за цялостна оценка на *ин vivo* антипсориатичния потенциал на RA са използвани няколко подхода. Първоначално е оценен ефектът на RA в изолирани от слезка на здрави мишки Т-клетки върху тяхната пролиферация (Фигура 18).

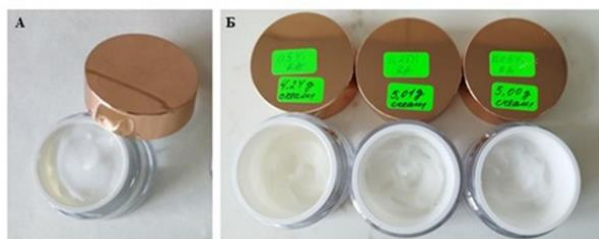


Фигура 18. Розмаринова киселина (RA), ефект върху клетъчната жизнеспособност на изолирани от слезка миши Т-клетки. Третирането с RA (25 μ M) на 24-ти и 48-ми час не

повлиява значително клетъчната жизнеспособност на Т-клетките. Данните са представени като процент от контролните клетки и са анализирани чрез еднопосочен тест ANOVA, последван от анализ за множествено сравняване Dunnett. Представителни данни от три независими експеримента (средна стойност $\pm$ стандартно отклонение; $n=4$ /група; $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.005$).

Анализът на данните показва, че няма драстична промяна в процента на анализираната Т-клетъчна популация (индикация за липса на отрицателно въздействие върху лимфоцитите; Фигура 18). По този начин, освен запазване на тяхната клетъчна жизнеспособност, в сравнение с третираните със специфичния Т-клетъчен стимул РМА клетки, резултатите също илюстрират отсъствие на неспецифично активиране на Т-клетките в резултат от третирането с RA. Взети заедно, тези констатации предполагат, че експерименталните концентрации на третиране с RA са безопасни за приложение и разкриват потенциален противовъзпалителен ефект, който може да бъде полезен за облекчаване на локалните симптоми на псориазис.

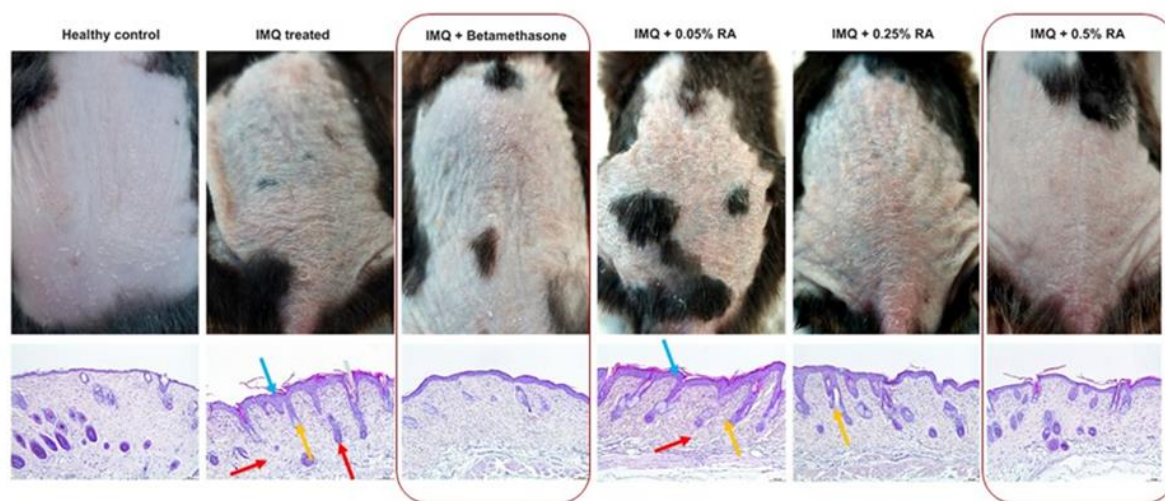
3.2. Локалното приложение на RA облекчава кожните прояви на псориазис при мишки
След потвърждаване на хипотезата, че RA не предизвиква провъзпалителен отговор в изолирани Т-клетки от здрави животни, допълнително е оценен анти-псориатичният потенциал на RA на ниво организъм. Още на втория ден от апликацията на IMQ крем е отчетено зачервяване и удебеляване на кожата, както и понижаване на телесното тегло на опитните животни. От 4-тия ден на третирането с IMQ крем е започната терапия с формулировките за локално приложение, които имат различно съдържание на RA (Фигура 19) и крем с бетаметазон.



Фигура 19. Крем със съдържание на розмаринова киселина (RA). (А) 0% RA; (Б) 0.05, 0.25, 0.50 % RA.

В настоящото проучване прилагането на IMQ предизвиква характерни псориатични хистологични характеристики, включително хиперкератоза, паракератоза в роговия слой,

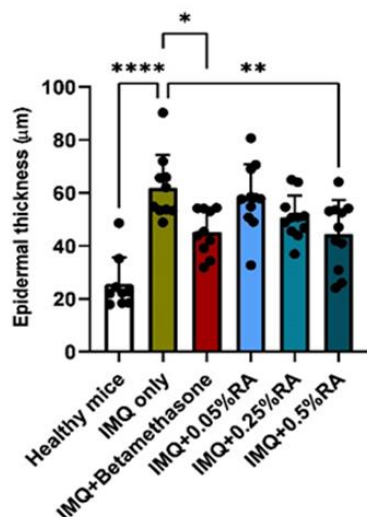
умерена акантоза, имунна клетъчна инфилтрация в дермата и възпаление на кожата, в съответствие с констатациите в литературата (van der Fits et al., 2009; Chen et al., 2020; Choi et al., 2021; Jin et al., 2021; Gangwar et al., 2022; Rai et al., 2022; Xiang et al., 2022; Köhler et al., 2024). Хистологичната оценка на кожни проби от контролната група животни показва нормален, тънък епидермис без възпалителни клетъчни инфилтрации. Същевременно анализът на кожните проби от животни с IMQ-индуциран псориазиформен дерматит установи инфилтрация на лимфоидни и полиморфонуклеарни клетки (червени стрелки) в дермата, значителна епидермална хиперплазия (оранжеви стрелки) и хиперкератоза (сини стрелки), наблюдавани шест дни след индукцията на псориазично възпаление (Фигура 20).



Фигура 20. Хистологична оценка на кожни проби от животни с имиквимод (IMQ)-индуциран псориазиформен дерматит, третирани с розмаринова киселина (RA; 0, 0.05, 0.25 и 0.50%) и бетаметазон (0.05%). Представителни изображения на животни от всички експериментални групи, заснети под светлинен микроскоп при увеличение 10x, както следва: здрава контрола (контрола), моделна група (IMQ), IMQ+Betamethasone, IMQ+RA. Кожните срезове са оцветени с хематоксилин/еозин. Червените стрелки показват инфилтрация на лимфоидни и полиморфонуклеарни клетки в дермата; оранжевите стрелки подчертават значителна епидермална хиперплазия, а сините стрелки посочват хиперкератоза.

Едновременно с това, в следствие от прилагането на RA, е регистрирано понижаване на степента на клетъчна инфилтрация в дермата (Фигура 20; на лимфоидните и полиморфонуклеарните клетки), което се свързва с редуцирано производство на цитокини и общо намаляване на възпалението (Li et al., 2016). Също така, при проведеното наблюдение е отбелязано подобрение в състоянието на кожата, облекчаване на

хиперкератозата на животните в третираните с RA групи, в сравнение с контролните животни (Фигура 20). Резултатите от анализа на хистологични срезове и стойностите от направените измервания на дебелината на кожата, ясно илюстрират постигане на псориазичния модел *ин vivo* и ефекта от третиране с RA (Фигури 20 и 21).

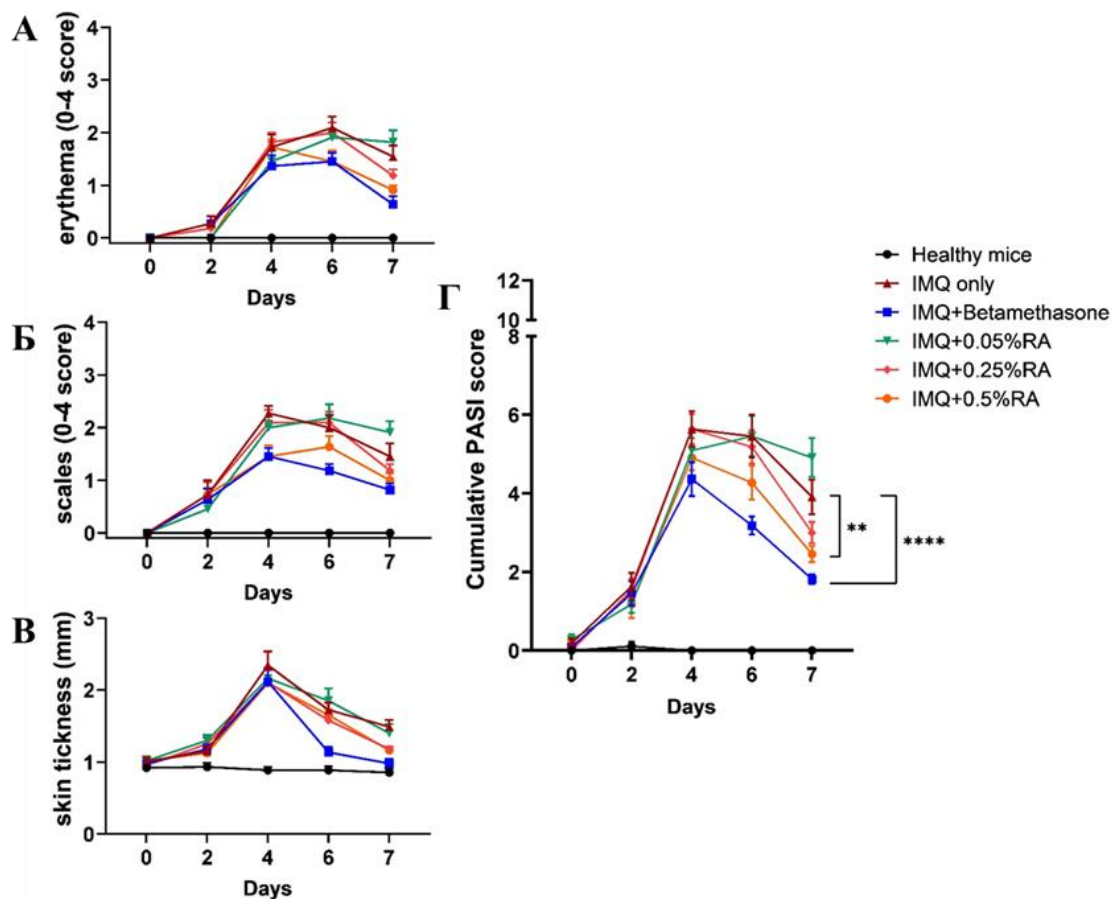


Фигура 21. Розмариновата киселина (RA) намалява епидермалното удебеляване в имиквимод (IMQ)-индуциран псориазиформен дерматит при C57BL/6 мишки. Графично представяне на епидермалната дебелина (μm). Данните са анализирани чрез еднопосочен ANOVA тест, последван от тест за множество сравняване Dunnett. Представителни данни от три независими експеримента (средна стойност ± стандартно отклонение; n=4/група; *p <0.05, **p <0.01, ***p <0.005, ****p <0.001).

Освен това, най-високата концентрация на локално приложение на RA (0.5%) доведе до значителна промяна - възстановяване на кожата на животните и редуциране на един от характерните маркери при псориазис - епидермалната хиперплазия (удебеляване на епидермиса), в сравнение със здравата контрола, до нива сравними с тези при третиране с положителната контрола (бетаметазон; Фигури 20 и 21). Този резултат е в съответствие с проучвания, които показват ефективността на локални лечения като акарбоза и циклоспорин А при IMQ-индуциран модел на псориазис (Chen et al., 2020). Прилагането на пиперлонгумин, включен в състава на 0.75% гел в дози 10 и 30 mg/kg (сравнено с маз съдържаща 20 mg/kg такролимус), е отслабило индуцираната с IMQ паракератоза и епидермална акантоза, и значително е намалил дебелината на ухото на третираните с пиперлонгумин групи мишки (Thatikonda et al., 2020).

Допълнително е определена тежестта на индуцирания псориазиформен дерматит и терапевтичният резултат от апликацията на RA с помощта на индекса PASI (Фигура 22).

Понижаване на PASI от поне 50% се счита за значително подобрене на псориазис (van der Fits et al., 2009; Chen et al., 2020; Rai et al., 2022; Xiang et al., 2022). Съгласно този критерий, терапията с 0.5% RA доведе до приблизително 50% понижаване на стойностите за PASI. Полученият в настоящия модел кумулативен PASI резултат показва, че локалното приложение на RA значително облекчава симптомите на индуцирания с IMQ псориазиформен дерматит, като еритема, лющене и дебелина на кожните лезии (Фигура 22).



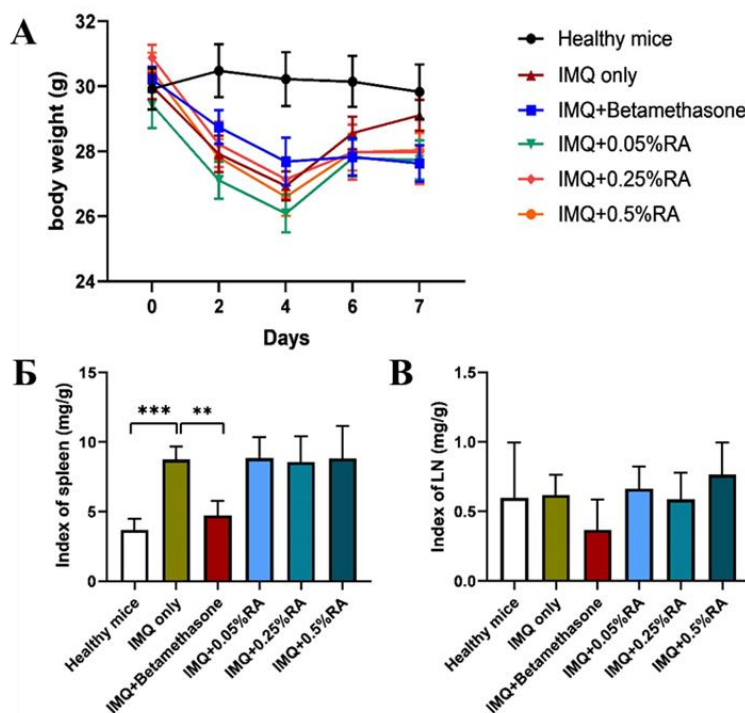
Фигура 22. Ефект на розмаринова киселина (RA) в имиквимод (IMQ)-индуциран псориазиформен дерматит при мишки. Представяне на (А-В) адаптиран PASI индекс (0-4), отчитащ степента на зачервяване, лющене, дебелината на кожата и кожните лезии; (Г) кумулативен PASI индекс. Данните са анализирани чрез еднопосочен тест ANOVA, последван от тест за множествено сравняване Tukey. Представителни данни от три независими експеримента (средна стойност $\pm$ стандартно отклонение; $n=4$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.005$, **** $p < 0.001$).**

Получените резултати са в съответствие с данни от предходни изследвания, оценяващи локалното приложение на различни индивидуални съединения като акарбоза, циклоспорин А, аноктамин-1, алантолактон, линалол и тетрандрин. Тези вещества са

показали ефикасност при облекчаване на предизвикани от IMQ кожни лезии в миши модел на псориазиформен дерматит (Chen et al., 2020; Thatikonda et al., 2020; Choi et al., 2021; Jin et al., 2021; Chen et al., 2022; Rai et al., 2022; Li et al., 2023). Други експериментални резултати, отново върху индуциран с IMQ миши модел на псориазис, са демонстрирали значително редуциране на: люспи, еритема и на удебеляване на кожата, придружено от понижено регулиране на експресиите на IL-17A, Ki67 и CD4⁺ T след локално приложение на зареден с индирубин микроемулсионен гел (He et al., 2022).

3.3. Ефекти от локалното приложение на RA в *ин vivo* модел на псориазично възпаление

Биологична крайна точка, като системният възпалителен отговор, възникващ както в слезката, така и в лимфните възли, се използва широко за изследване на терапевтичната ефикасност при псориазис *ин vivo* (Jabeen et al., 2020; Li et al., 2023). Данни за такава оценка в настоящия експеримент са представени във Фигура 23.



Фигура 23. Ефект на розмаринова киселина (RA) в имиквимод (IMQ)-индуциран псориазиформен дерматит при мишки. Представяне на (А) телесно теглото на експерименталните животни; (Б) индекс на слезката и (В) индекс на лимфните възли, изчислени спрямо телесното тегло на животните. Данните са анализирани чрез еднопосочен тест ANOVA, последван от тест за множествоно сравняване Dunnett. Представителни данни от три независими експеримента (средна стойност $\pm$ стандартно отклонение; $n=4$ /група; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$).

В рамките на проведеното проучване не е наблюдаван ефект на понижаване на телесното тегло в групите, третирани с RA, в сравнение с групите животни, третирани единствено с IMQ. Отчетено е значително редуциране на теглото на слезката на животните, на които е приложен бетаметазон. Съпоставени с контролните групи, резултатите показващи липса на системни ефекти върху теглото на животните, върху размера на слезката и на лимфните възли потвърждават предимно локалното действие на мястото на приложение на емулсията с RA.

В обобщение, настоящото проучване подчертава потенциалната терапевтична роля на съдържащите RA емулсии за облекчаване на кожните симптоми на псориазис. Получените резултати демонстрират, че RA ефективно инхибира прогресията на индуцирания с IMQ псориазиформен дерматит при мишки и намалява образуването на псориаитични лезии, подкрепяйки заключенията относно потенциала на RA като терапевтичен агент за контрол на псориазис. Тези резултати допринасят към нарастващия интерес към използването на природни съединения с противовъзпалително действие в дерматологичната терапия.

4. Заключение

Настоящият дисертационен труд включва ефективно приложение на ЯМР и ВЕТХ за метаболитно профилиране на биотехнологично получени екстракти от клетъчни суспензии на *L. angustifolia* и *H. procumbens*. В анализирания екстракти са идентифицирани и количествено определени растителни вторични метаболити - RA, VER и LEU. Също така с помощта на съвременните „омикс“ подходи е изследвана противовъзпалителната активност на екстрактите и техните основни индивидуални съединения в *ин витро* модел на псориазис, базиран на стимулирани с IFN- γ /IL-17A/IL-22 човешки кератиноцити HaCaT. Изследвани са молекулярните механизми на тяхното действие и са предложени потенциални механизми на антипсориаитичната им активност.

Анализите с RT-qPCR и имуноблот разкриха, че екстрактът от *L. angustifolia* и RA инхибират JAK2/STAT1 сигнализирането. Екстрактът от *L. angustifolia* също така показва инхибиране на кинази PI3K и AKT, свързано с намалена хиперпролиферация на кератиноцитите. Отделно, за разлика от VER и екстракта от дяволски нокът, LEU подобри предизвиканото подобно на псориазис възпаление чрез потискане на сигнализацията през PI3K/AKT в индуцирани с IFN- γ /IL-17A/IL-22 клетки HaCaT. Получените резултати показват, че LEU може да прояви терапевтичен потенциал при псориазис чрез регулиране на епидермалната диференциация, посредством инхибиране на пътя на AKT. Анализът на получените данни извеждат RA като съединение с най-значими противовъзпалителни и

съответно антипсориатични ефекти при проведените *ин витро* експерименти. Предложеният механизъм на действие на RA се свързва с инхибиране на възпалителни сигнални пътища. Терапевтичната активност на RA е валидирана с помоща на добре установения *ин vivo* модел на IMQ-индуциран псориазиформен дерматит при мишки C57BL/6, в които локалното приложение на RA значително облекчава фенотипните и хистопатологични прояви на псориатично възпаление. Въпреки постигнатите резултати, настоящото изследване е ограничено до предклиничен модел. Необходими са допълнителни клинични проучвания, които да потвърдят безопасността, оптималната дозировка и дългосрочната ефикасност на RA за третиране на псориазис при хора.

V. ИЗВОДИ

1. Установен е фитохимичния профил на екстракти от клетъчни суспензии на *L. angustifolia* и *H. procumbens*.
2. Количествено е определено съдържанието на изследваните вторични метаболити - розмаринова киселина, вербаскозид и левкосептозид А в изследваните растителни екстракти.
3. Успешно са адаптирани и приложени два модела на псориазис: *ин vitro* модел на псориазис при човешки епидермални кератиноцити (HaCaT) и *ин vivo* модел на псориазиформен дерматит при мишки (C57BL/6).
4. Екстрактът от клетъчна суспензия на *L. angustifolia* потиска псориазичното възпаление в човешки кератиноцити чрез инхибиране на сигнален път JAK2/STAT1.
5. Левкосептозид А, изолиран от екстракт на клетъчна суспензия на *H. procumbens* подобрява предизвиканото от псориазис възпаление чрез потискане на сигнализирането на PI3K/AKT в активирани с IFN- γ /IL-17A/IL-22 клетки HaCaT.
6. Биотехнологично полученият екстракт от *L. angustifolia* и индивидуалните чисти съединения розмаринова киселина и левкосептозид А притежават потенциал да бъдат включени във формулировки за локално приложение, които могат да бъдат използвани като нов терапевтичен подход за облекчаване на външните проявления на псориазис.
7. Локалното приложение на розмаринова киселина облекчава кожните симптоми на индуцирано с имиквимод псориазично възпаление на организмово ниво.

VI. ПРИНОСИ

С научно-фундаментален характер:

1. Установена е антипсориатичната активност на екстракт от *L. angustifolia*, както и на розмаринова киселина и на левкосептозид А, в *ин витро* модел на псориазис при човешки епидермални кератиноцити (HaCaT).
2. Идентифицирани са ключови молекулярни сигнални пътища, участващи в механизма на антипсориатично действие на *L. angustifolia*, розмаринова киселина и левкосептозид А в HaCaT клетки.

С научно-приложен характер:

1. Въведен и оптимизиран е *ин витро* модел на псориазис, който може да се използва като скринингова платформа за оценка на антипсориатична активност на растителни екстракти и природни съединения.
2. Адаптиран е *ин vivo* модел на псориазис за изследване на фенотипна проява на кожно възпаление, при мишки от линията C57BL/6, който служи като платформа за предклинична оценка за антипсориатичен потенциал на съединения от различен произход, лекарствени или козметични формулировки за приложение върху кожа.
3. Получените данни за молекулярните механизми на действие на *L. angustifolia*, розмаринова киселина и левкосептозид А могат да послужат като научна основа за разработване на ефективни терапевтични средства, насочени към облекчаване на кожните прояви при псориазис.
4. Установен е потенциалът на розмаринова киселина като активна съставка за включване във формулировки за локално приложение, предлагащи нов терапевтичен подход за третиране на псориазис.

Благодарности

Признателна съм на научния ми ръководител проф. д-р Милен Георгиев за предоставената възможност да работя по актуална и интересна тема, за професионалните насоки, ръководенето и организацията на настоящия дисертационен труд.

Изказвам своята благодарност и на колегите от лаборатория „Метаболомика“, Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН, за оказаната подкрепа, с особена признателност към доц. д-р Лилия Михайлова за ценните напътствия. Искрено благодаря на доц. д-р Николина Михайлова от департамент „Имунология“, Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН, за съвместната работа по адаптирането на *ин vivo* модел на псориазис и експериментална работа по *ин vivo* експериментите, представени в дисертацията, както и на доц. д-р Калина Алипиева, Институт по органична химия с Център по фитохимия – БАН, за съвместната работа по фитохимичния анализ на изследваните екстракти. Благодарна съм на доц. д-р Андрей Марчев от департамент „Биотехнология“, Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН за съдействието при анализа на получените ЯМР спектри. Оценявам високо сътрудничеството на проф. д-р Густино Орландо и доц. д-р Клаудио Феранте, Университет „Г. Д'анунцио“, Кieti, Италия, по молекулярния докинг анализ на изследваните съединения.

Изразявам своята признателност към ръководството на Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН за институционалната подкрепа и създадените условия за провеждане на научни изследвания, както и към ръководството на Центъра по растителна системна биология и биотехнология, гр. Пловдив за предоставения достъп до високо-технологична апаратура.

Сърдечно благодаря на моето семейство и близки за безценната подкрепа, вярата им в мен и проявеното търпение през целия процес на разработване и обобщаване на този дисертационен труд.

Научните изследвания, представени в настоящия дисертационен труд, са осъществени с финансова подкрепа по проект PlantaSYST (SGA No. 739582 и FPA No. 664620) част от програма „Хоризонт 2020“ на Европейския Съюз, както и по проект BG05M2OP001-1.003-001-C01, финансиран от Европейски Фонд за регионално развитие чрез оперативна програма „Наука и образование за интелигентен растеж“ и договор №: КП-06-Н51/14 финансиран от фонд „Научни изследвания“.

Публикувани материали по темата на дисертацията

Научни публикации

1. **Koycheva I.K.**, Marchev A.S., Stoykova I.D., Georgiev M.I. (2025) Natural alternatives targeting psoriasis pathology and key signaling pathways: A focus on phytochemicals. *Phytochemistry Reviews*, 24: 2147-2173 (**IF₂₀₂₄ 7.6; Q1**).
2. Perra M., Fancello L., Castangia I., Allaw M., Escibano-Ferrer E., Peris J.E., Usach I., Manca M.L., **Koycheva I.K.**, Georgiev M.I., Manconi M. (2022) Formulation and testing of antioxidant and protective effect of hyalurosomes loading extract rich in rosmarinic acid biotechnologically produced from *Lavandula angustifolia* Miller. *Molecules*, 27(8): 2423 (**IF₂₀₂₂ 4.6; Q2**).
3. **Koycheva I.K.**, Vasileva L.V., Amirova K.M., Marchev A.S., Balcheva-Sivenova Z.P., Georgiev M.I. (2021) Biotechnologically produced *Lavandula angustifolia* Mill. extract rich in rosmarinic acid resolves psoriasis-related inflammation through Janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling. *Frontiers in Pharmacology*, 12: 680168 (**IF₂₀₂₁ 5.988; Q1**).
4. **Koycheva I.K.**, Mihaylova L.V., Todorova M.N., Balcheva-Sivenova Z.P., Alipieva K., Ferrante C., Orlando G., Georgiev M.I. (2021) Leucosceptoside A from Devil's claw modulates psoriasis-like inflammation via suppression of the PI3K/AKT signaling pathway in keratinocytes. *Molecules*, 26(22): 7014 (**IF₂₀₂₁ 4.927; Q2**).
5. Marchev A.S., Vasileva L.V., Amirova K.M., Savova M.C., **Koycheva I.K.**, Balcheva-Sivenova Z.P., Vasileva S.M., Georgiev M.I. (2021) Rosmarinic acid - from bench to valuable applications in food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 117: 182-193 (**IF₂₀₂₁ 16.002; Q1**).

Общ импакт фактор (IF): 39.1

Участия на научни форуми

Устни доклади

1. Georgiev M.I., **Koycheva I.K.** (2023) Anti-psoriatic potential of plant natural compounds. *The 9th International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants*, 03-05 May, Ankara, Turkiye, Keynote lecture.
2. Georgiev M.I., **Koycheva I.K.** (2023) The anti-psoriatic potential of natural compounds. *The 7th International Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food (7-ISPMF)*, 02-06 August, Guangzhou, China, Plenary lecture.

Постерни презентации

1. **Koycheva I.K.**, Todorova M.N., Amirova K.M., Balcheva-Sivenova Z.P., Marchev A.S., Vasileva L.V., Georgiev M.I. (2021) *In vitro* therapeutic effects of *Lavandula angustifolia* extract and rosmarinic acid on psoriasis dermatitis. *The 1st International Conference on Plant Systems Biology and Biotechnology*, 14-17 June, Golden Sands Resort, Bulgaria, PP. 18.
2. **Koycheva I.K.**, Todorova M.N., Stoykova I.D., Balcheva-Sivenova Z.P., Vasileva L.V., Georgiev M.I. (2021) *Harpagophytum procumbens* exerts potential in psoriasis managment. *The 1st International Conference on Plant Systems Biology and Biotechnology*, 14-17 June, Golden Sands Resort, Bulgaria, PP. 46.