



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

**Моника Николаева Тодорова**

**МОДУЛИРАНЕ НА МЕХАНИЗМИТЕ ЗА  
УДЪЛЖАВАНЕ ПРОДЪЛЖИТЕЛНОСТТА НА  
ЖИВОТА ПРИ *CAENORHABDITIS ELEGANS* ЧРЕЗ  
ИЗПОЛЗВАНЕ НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ  
ВЕЩЕСТВА**

**АВТОРЕФЕРАТ**

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

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

**Пловдив, 2026**

Дисертационният труд е написан на 163 страници. Той е онагледен с 31 фигури и 12 таблици. Цитирани са 271 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 състои на 21.04.26 година.

Докторантът е отчислен с право на защита със Заповед № I-184/17.12.24 година на директора на ИМикБ – БАН, проф. д-р Пенка Петрова, дн.

**Членове на научното жури:**

Доц. д-р Николина Михайлова

Проф. д-р Милка Милева

Проф. д-р Милена Георгиева, дб

Чл.-кор. проф. д-р Алберт Кръстанов, дтн

Проф. д-р Петко Денев

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

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

<b>Съдържание:</b>	
<b>Използвани съкращения и символи</b>	4
<b>I. ВЪВЕДЕНИЕ</b>	5
<b>II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ</b>	7
<b>III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ</b>	9
<b>IV. РЕЗУЛТАТИ</b>	18
1. Установяване на ефекта на икариин върху устойчивостта към стрес и продължителността на живот при <i>C. elegans</i>	18
2. Метаболитно профилиране и изследване потенциала на екстракт от листа на <i>P. granatum</i> да модулира процесите на стареене	27
3. Оценка на потенциала на сок от <i>P. granatum</i> като функционална храна с геропротективен ефект	38
4. Изследване на ефектите на ADAPT-232 върху продължителността на живот и митохондриалната функция	42
<b>V. ДИСКУСИЯ</b>	49
1. Икариин подобрява устойчивостта на стрес и удължава продължителността на живота при <i>C. elegans</i> чрез <i>hsf-1</i> и <i>daf-2</i> -медиран хорметичен отговор	50
2. Екстракт от листа на <i>P. granatum</i> чрез взаимодействието на сигналните пътища HLH-30/TFEB, DAF-16/FOXO и SKN-1/NRF2	51
3. Сок от <i>P. granatum</i> подобрява физиологичния спад свързан със стареенето и модулира отговора към стрес	54
4. Комбинираният продукт ADAPT-232 забавя процесите на стареене и подобрява митохондриалната функция	55
5. Заключение и бъдещи насоки	55
<b>VI. ИЗВОДИ</b>	56
<b>VII. ПРИНОСИ</b>	57
<b>Благодарности</b>	58
<b>Публикувани материали по дисертацията</b>	59

## Използвани съкращения и символи:

$\Delta\Psi_m$  – митохондриален мембранен потенциал

a.u. – условни единици/arbitrary units

На български език:

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

иРНК – информационна РНК

РНК – рибонуклеинова киселина

ЯМР – ядрено-магнитен резонанс

На английски език:

ADAPT-232 – ADAPT® Energy Boost

АКТ – протеин киназа В

АМПК – аденозинмонофосфат-активирана протеин киназа

АРОЕ – аполипопротеин Е

АТФ – аденозинтрифосфат

cDNA – комплементарна ДНК

CI – индекс на хемотаксис

CRP – С-реактивен протеин

DMSO – диметилсулфоксид

ER – ендоплазмен ретикулум

fmo-2 – флавин-съдържаща монооксигеназа 2

FOXO – транскрипционен фактор от семейство

Forkhead box O

GH – растежен хормон

HIF-1 – хипоксия-индуцируем фактор-1

HSF-1 – фактор на топлинния шок 1

HSPs – протеини на топлинния шок

IGF-1 – инсулиноподобен растежен фактор 1

IGF-1R – IGF-1 рецептор

IIS – инсулин/инсулиноподобната сигнализация

IL – интерлевкин

iPSC – индуцирани плурипотентни стволови клетки

JAK – Янус киназа

JNK – c-Jun N-терминалната киназа

L1 – ларвен стадий 1

L2 – ларвен стадий 2

L3 – ларвен стадий 3

L4 – ларвен стадий 4

MAPK – митоген-активирана протеин киназа

mTOR – механистичната мишена на рапамицин

mTORC1 – комплекс 1 на механистичната

таргетна киназа на рапамицин

MTT – 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-

дифенилтетразолиев бромид

MVG – MitoView Green

N2 – див тип *C. elegans*

NAD<sup>+</sup> – никотинамид аденин динуклеотид

NF-κB – ядрен фактор κB

NGM – хранителна среда за нематоди

NLRP3 – пирин домейн-съдържащ протеин 3

NMN – никотинамид мононуклеотид

NRF2 – ядрен фактор еритроиден 2-свързан фактор 2

One-way ANOVA – еднопосочен анализ на дисперсията

PGC-1α – коактиватор 1-α на рецептора, активиран от пролифератори на пероксисоми

PGJ – лиофилизиран сок от *P. granatum*

PGL – екстракт от листна маса от *P. granatum*

PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа

ROS – реактивни кислородни видове

RT-qPCR – полимеразна верижна реакция в реално време

SASP – секреторен фенотип, асоцииран със стареене

SEM – стандартна грешка на средната стойност

SIRT6 – NAD<sup>+</sup>-зависимите хистон-деацетилази от семейството на сиртуините

TFEB – транскрипционен фактор EB

TGF-β – трансформиращ растежен фактор β

TMRE – тетраметилродамин етилов естер

TNF-α – тумор-некротичен фактор алфа

UPR – отговор към неправилно нагънати протеини

## I. ВЪВЕДЕНИЕ

Старееенето е сложен и многофакторен биологичен процес, характеризиращ се с постепенно натрупване на молекулярни и клетъчни увреждания, функционален спад на организма и повишен риск от заболявания (Argentieri et al., 2024; Cohen et al., 2022; Shen et al., 2024). Взаимодействието между генетични, епигенетични и фактори на средата, определят както продължителността на живота, така и динамиката на възрастово-свързаните промени, които се натрупват на молекулярно, клетъчно и физиологично ниво (Fuellen et al., 2019; López-Otín et al., 2013; 2023).

През последния век средната продължителност на живота значително се увеличава благодарение на напредъка в медицината, фармацевтиката и технологиите. Наред с това обаче се отчита прогресивно застаряване на населението, което се очертава като едно от най-сериозните предизвикателства пред съвременното общество (Chen et al., 2018; Guo et al., 2022). Делът на хората над 65-годишна възраст нараства както в Европейския съюз, така и в глобален мащаб, като прогнозите сочат допълнително увеличаване през следващите десетилетия – ако през 2021 г. един от всеки десет души е бил на 65 или повече години, то се очаква до средата на века това да бъде един от всеки шест (Chang et al., 2019). Въпреки удължаването на живота, годините, прекарани в добро здраве, не нарастват пропорционално като приблизително 16–20% от живота преминава във влошено здравословно състояние в резултат на хронични, свързани с възрастта заболявания (Chen et al., 2018, 2025).

Старееенето засяга сензорните, двигателните и когнитивните функции и представлява основен рисков фактор за развитието на невродегенеративни заболявания (напр. болест на Алцхаймер и Паркинсон), сърдечно-съдови и метаболитни нарушения, както и някои видове неоплазии. В основата на тези патологии е натрупването на молекулярни увреждания и дисбаланс в клетъчната хомеостаза. (Tyshkovskiy et al., 2023). През последните десетилетия са дефинирани ключови молекулярни и клетъчни механизми на старееенето, включително нарушена протеостаза, митохондриална дисфункция, хронично възпаление, епигенетични изменения, намалена репаративна способност и метаболитна дисрегулация (López-Otín et al., 2013; 2023). Тези открития поставят основата за разработване на интервенции, насочени към модулиране на сигнални пътища, регулиращи процесите на старееене.

В съвременната биомедицинска наука, старееенето се разглежда като основен рисков фактор и първопричина за развитието на повечето хронични незаразни

заболявания (Chang et al., 2019; Guo et al., 2022). Натрупващи се експериментални и клинични данни подкрепят концепцията, че забавянето на процеса на стареене може не само да намали риска от мултиморбидност, но и да удължи периода на живот, прекаран в добро здраве (Fahy et al., 2019; Fong et al., 2024; Kok et al., 2025; Liu et al., 2025). Ето защо съвременната наука е изправена пред предизвикателството да открие иновативни подходи за забавяне на биологичното стареене, удължаване на периода, прекаран в добро здраве, и намаляване на риска от възрастово-свързани патологии.

Сред перспективните подходи за модулиране на стареенето е приложението на растителни екстракти и функционални храни с богат фитохимичен състав (Fahey et al., 2021; Guo et al., 2022; Longo and Anderson, 2022). Природните продукти представляват ценен източник на вторични метаболити с доказани ползи за здравето, дължащи се на техните противовъзпалителни, невропротективни и метаболитно-регулиращи свойства (Atanasov et al., 2021; Li et al., 2024). Всичко това ги превръща в обещаващи кандидати за насърчаване на здравословното дълголетие.

Изследването на механизмите на стареене и ефектите на потенциални геропротективни интервенции изисква използването на подходящи моделни организми. Нематодът *Caenorhabditis elegans* е широко утвърден експериментален модел в изследванията върху процесите на стареене и дълголетие поради краткия си жизнен цикъл, напълно секвенирания и добре охарактеризиран геном, както и наличието на еволюционно конзервативни сигнални пътища, споделени с по-висшите организми, включително човека (Lin et al., 2023; Mack et al., 2018). Тези характеристики го правят особено подходящ за предклинична оценка на ефектите на природни продукти върху продължителността на живота, устойчивостта към стрес, метаболитната хомеостаза и митохондриалната функция.

Въз основа на горе-изложеното, настоящият дисертационен труд има за цел да изследва потенциала на подбрани природни продукти, като растителни екстракти, биологично активни вещества и функционални храни, да модулират ключови процеси, свързани със стареенето, използвайки *C. elegans* като моделна система. Чрез интегриране на фенотипни, молекулярни и функционални анализи, изследването цели да допринесе за по-задълбочено разбиране на механизмите, чрез които природните продукти могат да подпомагат здравословното стареене и да послужат като основа за разработване на нови геропротективни стратегии.



## 2. Задачи

За осъществяване на целта на настоящия дисертационен труд са поставени следните задачи:

- 2.1. Подбор на растителни видове и вторични метаболити с потенциален ефект върху продължителността на живота на *C. elegans*.
- 2.2. Усвояване на методики за култивиране на *C. elegans*, охарактеризиране протичането на физиологичните процеси, определяне продължителността на живот и преживяемостта при индуциране на стрес от различен произход.
- 2.3. Адаптиране на методи за проследяване на процесите на ядрена транслокация на избрани протеини при *C. elegans*.
- 2.4. Разработване на модел на митохондриална дисфункция при *C. elegans* и интегриране на методи за проследяване на митохондриалната динамика.
- 2.5. Определяне ефекта на икариин върху продължителността на живот, устойчивостта на стрес и базалния липиден метаболизъм при *C. elegans* и изясняване на механизма му на действие.
- 2.6. Метаболитно профилиране на екстракт от листна маса от *Punica granatum* L. (нар), изследване на ефекта му върху продължителността на живот, устойчивостта на стрес и базалния липиден метаболизъм при *C. elegans* и установяване на молекулярния механизъм.
- 2.7. Определяне на потенциала на сок от плодове от *P. granatum* за подобряване на качеството и продължителността на живот при *C. elegans*.
- 2.8. Изследване потенциала на стандартизиран комбиниран продукт, съдържащ екстракти от адаптогенни лечебни растения, за удължаване на живота при *C. elegans*.

### III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### 1. Материали

##### 1.1. Химикали, реактиви, чисти вещества и растителни продукти

Хранителна среда за растеж на нематоди NGM (#MBS652667) е закупена от MyBiosource Inc (Сан Диего, Калифорния, САЩ). Хранителен бульон Лурия-Бертани (LB) модификация по Ленокс (#L3022), монтираща среда за хистологични препарати (#F6182), разтвор на Nile Red (NR, #72485), агар (#05039), M9 соли буфер (#M6030), DMSO, изопропанол, реагент на Bradford, лизиращ буфер (radioimmunoprecipitation assay, RIPA), коктейл от протеазни и фосфатазни инхибитори (#PPC1010), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид (МТТ; #M2128), натриев хидроксид, метилвиологен (чистота  $\geq 98\%$ ), както и всички останали стандартни химични реагенти са закупени от Sigma-Aldrich Co (Сейнт Луис, Мисури, САЩ). Всички реагенти и консумативи за изолиране на РНК, гел електрофореза и RT-qPCR анализ са закупени от Bio-Rad (Херкулес, Калифорния, САЩ). Деутерирани метанол и вода са доставени от Deutero GmbH (Касбелаун, Германия). Антителата, използвани за имуноблот анализ, включват антитяло срещу фосфорилиран АМПК (pAMPK, #2535), доставено от Cell Signaling Technology (Лайден, Нидерландия), hFAB Rhodamine антитяло срещу бета-актин (#12004164) и вторично антитяло IgG StarBright Blue 700 (#12004162), доставени от Bio-Rad. Тетраметилродамин, етилов естер (TMRE, #11560796), е получен от Invitrogen. MitoView™ Green (MVG, #70,054) е осигурен от Biotium, Inc. (Фримонт, Калифорния, САЩ). Икарииин (молекулно тегло 676.66 g/M; чистота  $\geq 99.06\%$ ; #HY-N0014) е закупен и доставен от MedChemExpress (Солентуна, Швеция). Комбинираният продукт, съдържащ екстракти от адаптогенни лечебни растения Adapt Life Energy Boost (#7392213640009) е произведен от Swedish Herbal Institute (Гьотеборг, Швеция) и закупен от аптечната мрежа.

##### 1.2. *Caenorhabditis elegans* щамове

В настоящото изследване са използвани следните щамове на *C. elegans*: див тип Bristol N2; CB1370 [*daf-2(e1370)* III]; MIR13 [*sir-2.1(ok434)* IV; *aak-2(ok524)* X]; RB754 [*aak-2(ok524)* X]; MAH240 *sqIs17* [*p<sub>hll-30</sub>HLH-30::GFP + rol-6(su1006)*]; LD1 *ldIs7* [SKN-1B/C::GFP + *rol-6(su1006)*]; OH16024 *daf-16* [ot971(*daf-16::GFP*) I] и SJ4143 *zcls17* [*ges-1::GFP(mit)*]. Всички щамове са придобити от Caenorhabditis Genetic Center (CGC, University of Minnesota, Минесота, САЩ).

## 2. Методи

### 2.1. Получаване на екстракт от листна маса от *P. granatum*

Семена на *P. granatum* са предоставени от Ботаническата градина за лечебни растения на Медицинския университет в Люблин, Полша (Medical University of Lublin, Poland). След покълване и период на растеж, листната маса на растението е събрана. Растителният материал е замразен, смлян и лиофилизиран посредством VirTis BenchTop Pro с Omnitronics™ от Genevac Ltd (Ipswich, Великобритания). Екстракцията е извършена с 50% метанол (съотношение растителна маса:екстрагент 1:30 w/v) в ултразвукова вана за 20 минути при стайна температура. Полученият екстракт е филтруван, концентриран посредством рорационен вакуум изпарител при температура 40 °C и съхранен при -20 °C до момента на употреба.

### 2.2. Екстракция на сок от плодовете на *P. granatum*

Цели плодове от нар са закупени от местен хранителен магазин, оставени са да се аклиматизират при стайна температура и са сортирани по еднородност, като плодовете с физически дефекти са отстранени. Сокът от нар е извлечен чрез механично пресоване на разрязани на половина плодове с помощта на сокоизстисквачка. Полученият сок е лиофилизиран с използване на VirTis BenchTop Pro с Omnitronics™ от Genevac Ltd (Ипсуич, Англия) и съхранен при -20 °C до момента на употреба.

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

Подготовката на пробите, снемането на спектрите и тяхната обработката са извършени по методика описана по-рано (Savova et al., 2021). Протонен (<sup>1</sup>H) и двумерни ЯМР спектри са снети на AVII+ 600 спектрометър Bruker (Карлсруе, Германия). Получените данни са обработени с помощта на специализиран софтуер MestReNova (версия 12.0.0 от Mestrelab Research, Сантяго де Компослета, Испания). Идентифицирането на съединения в екстракта от листа на нар е извършено чрез сравняване на получените спектрални данни с тези в литературата.

### 2.4. Култивиране на *C. elegans* и третиране

Нематодите са култивирани върху блюда на Петри с твърда среда NGM, използвайки бактерията *E. coli* OP50 като хранителен източник. Хранителната среда за култивиране е приготвена съгласно инструкциите на производителя и автоклавирана за 15 мин, след

което е оставена да се охлади до 45 °C и е разлята върху петриевите блюда. Бактериалната култура е отглеждана в течна среда Лурия-Бертани (LB) при 37 °C с постоянно разклащане до достигане на експоненциална фаза на растеж. След това по 120 µL от културата е посята върху повърхността на NGM средата и инкубирана при 37 °C за 6 часа или при стайна температура за 24 часа.

Трансферът на нематодите върху свежа хранителна среда е извършен чрез два метода: прехвърляне на фрагмент от хранителната среда, съдържащ нематоди, със стерилен скалпел върху нова хранителна среда или индивидуално прехвърляне на червеи чрез стерилизирана платинена жичка с огънат накрайник.

За целите на описаните експерименти е получена възрастово-синхронизирана популация от ларви чрез стандартно третиране на възрастни индивиди, намиращи се в репродуктивен период, с разтвор на NaOH (5 N) и натриев хипохлорит (5%) в съотношение 1:2. След получаване на синхронна популация от яйца и тяхното излюпване, през последващите два ларвни стадия на развитие (L1 и L2) нематодите са изложени на стандартни условия на култивиране с хранителен източник *E. coli* OP50. За периода на третиране с избраните екстракти и вещества, включващ ларвни стадии L3 и L4, както и възрастни индивиди, е използвана топлинно инактивирана (65 °C на водна баня за 30 мин) и концентрирана десетократно *E. coli* OP50, за да се избегне модифициране на екстрактите и веществата от бактериалния метаболизъм.

Концентрациите на експерименталните третираня с икариин (10, 50 и 100 µM), екстракт от листна маса (50, 100 и 200 µg/mL) и сок (50, 100 и 200 µg/mL) от *P. granatum* и ADAPT-232 (50, 100 и 200 µg/mL) са избрани на база литературни данни и/или проведен анализ за оценка на жизненост. Третиране с носител (Vehicle) – 0.2% DMSO е използвано като контролна група за сравнение на получените резултати при експерименталните третираня.

За експериментите включващи изследване потенциала на тестваните екстракти и вещества върху нарушен липиден метаболизъм и митохондриална дисфункция, към хранителната среда за култивиране е добавен стерилен, концентриран разтвор на глюкоза до крайна концентрация 2%.

## 2.5. Фенотипни показатели – двигателна активност

След преминаване в стадий „млад индивид“ нематоди от всички експериментални групи са третирани със съответните концентрации от тестваните екстракти или вещества за

период от 5 и 10 дни. Движенията на огъване на тялото са оценени на 5<sup>-и</sup> и 10<sup>-и</sup> ден от индивидуалното развитие. На случаен принцип са избрани и поставени в капка M9 буфер 15 нематода от контролната и експерименталните групи, след което са оставени да се аклиматизират за 30 секунди. Броят на огъванията на тялото в рамките на 30-секунден интервал е отчетен с помощта на стереомикроскоп (Kern and Sohn GmbH, Балинген, Германия). Тестът е извършен в три независими биологични повторения.

#### 2.6. Фенотипни показатели – репродуктивен капацитет

За анализ на репродуктивния капацитет на *C. elegans* от всяка експериментална група на случаен принцип са избрани най-малко пет нематоди, които са подложени на третиране с изследваните екстракти или чисти вещества. След достигане на полова зрялост броят на снесените яйца от всеки индивид е отчитан ежедневно до края на репродуктивния период. Експериментите са проведени в три независими повторения.

#### 2.7. Морфологични показатели

Анализът на морфологични показатели на *C. elegans*, включително средната дължина, ширина и площ на тялото, е извършен с автоматичната система за наблюдение на нематоди WormLab (MBF Bioscience). Всяко видео, използвано за анализа, е записано с продължителност от 1 минута и след това е анализирано с помощта на софтуер WormLab (версия 3.1.0, MBF Bioscience; Yue et al., 2021; Sun et al., 2016). Експериментът е извършен в три независими повторения, всяко от което включва не по-малко от 15 нематода.

#### 2.8. Оценка на жизненост

Отсъствието на токсичност или негативно повлияване на жизнеността, предизвикано от експерименталните третираня съответно с икариин (в диапазон от концентрации между 0.1 и 100  $\mu\text{M}$ ), екстракт от листна маса и сок от *P. granatum* (в диапазон от концентрации между 10 и 200  $\mu\text{g/mL}$ ), е потвърдено чрез провеждане на МТТ анализ (Yellurkar et al., 2021). Накратко, нематоди в ларвен стадий L1 са изложени на експериментални третираня в продължение на 48 часа, след което са промити с M9 буфер и инкубирани с МТТ разтвор (5  $\text{mg/mL}$ ) в продължение на 3 часа. След образуване на формазанови кристали реагентът е отстранен, а пробите са инкубирани с DMSO за 1 час с цел пълна солубилизация на формираните кристали. Абсорбцията е отчитана при дължина на

вълната 575 nm посредством спектрофотометър Anthos Zenyth 340 (Biochrome, Берлин, Германия).

## 2.9. Проследяване на продължителност на живота

За оценка продължителността на живота, от синхронна популация в късен четвърти ларвен стадий (L4) на случаен принцип са селектирани минимум 30 индивида, които са прехвърлени на свежа среда, съдържаща експерименталните третираня. Този ден се приема за ден 0 от жизнения им цикъл. От този момент нематодите са подложени на ежедневно наблюдение, като за определяне на преживяемостта е приложен външен механичен стимул – леко докосване с платинена жичка. Индивидите, които не показват движение и не реагират на стимула, се считат за мъртви. Експериментът е проведен до смъртта на последния индивид от всяка група и е извършен в три независими повторения.

## 2.10. Анализ за хемотаксис

Петриево блюдо с NGM е разделено на четири квадранта. Два от тях, съдържащи съответното третиране, са определени за тестови, а срещуположните на тях, съдържащи инактивирана *E. coli* OP50, са определени за контроли. Във всеки квадрант на идентично разстояние от центъра на петритото са отпипетирани по 2  $\mu$ L от съответната проба и са оставени да просъхнат. От концентрирана суспензия с нематоди в M9 буфер са отпипетирани 2  $\mu$ L, в които се съдържат приблизително 100 – 150 нематода в стадий L4 и са поставени в центъра на петритото. След едночасова инкубация при 20 °C петритото е оставено при температура 4 – 6 °C за 30 мин с цел имобилизиране на нематодите за по-лесно отчитане на резултатите. Изброен е общият брой червеи, както и броят червеи във всеки квадрант. Индексът на хемотаксис (CI) е изчислен по следната формула:  $CI = (\text{тестова зона в квадрант 1} + \text{тестова зона в квадрант 2}) - (\text{контролна зона в квадрант 1} + \text{контролна зона в квадрант 2}) / \text{общ брой нематоди}$ .

## 2.11. Модели на стрес – топлинен и оксидативен стрес

За моделиране на стресови условия експерименталните животни са изложени на топлинен и оксидативен стрес в две времеви точки от жизнения им цикъл – ден 5 и ден 10, съответно представящи млади индивиди и индивиди в зряла възраст. От всяка експериментална група са използвани минимум 30 нематода, които са подложени на

стресови условия, а тяхната преживяемост е оценявана чрез наблюдение под микроскоп и прилагане на механичен стимул. Експериментите за оценка на преживяемостта при двата вида стрес са проведени в три независими повторения.

За индуциране на топлинен стрес при анализите с икариин нематодите от всички експериментални групи са изложени на температура 37 °С. Преживяемостта е проследявана чрез прилагане на механичен стимул на всеки два часа в рамките на 14 часа, до смъртта на последния индивид.

При анализите с екстракт от листна маса на нар, сок от нар и комбинация продукт ADAPT-232 топлинният стрес е индуциран при 37 °С за 2 часа, последван от 20-часов период на възстановяване при 20 °С. След изтичането на периода на възстановяване преживяемостта е отчетена чрез механичен стимул – докосване с платинена жичка. Индивидите, които не реагират на стимул, са отчетени като мъртви.

За индуциране на оксидативен стрес към хранителната среда (NGM) е добавен метилвиологен до крайна концентрация 50 mM. Нематодите от всяка експериментална група, предварително третирани с изследваните природни продукти, са поставени в условия на оксидативен стрес, а тяхната преживяемост е оценявана на всеки 24 часа чрез механичен стимул, аналогично на протокола за топлинен стрес.

## 2.12. Оцветяване на липидни натрупвания

Натрупването на липиди в *C. elegans* е оценено с помощта на липидоразтворимото багрило Nile Red. След третиране с избраните експериментални концентрации за период от 24 часа, приблизително 1000–1500 ларви в стадий L4 са събрани, промити трикратно с M9 буфер, центрофугирани и фиксирани с 40% разтвор на изопропанол за 3 мин.

След центрофугиране и отстраняване на супернатантата към фиксирани нематоди е добавен работен разтвор на Nile Red. Пробите са инкубирани на тъмно за 2 часа, след което разтворът на багрилото е отстранен. Получената пелета е промита с 500 µL PBS с 0.01% Triton X-100 (PBST) за 30 мин, последвано от центрофугиране и частично отстраняване на надутаечната течност. Пелетата от оцветени нематоди е ресуспендирана в 100 µL PBST. Липидните натрупвания са визуализирани с помощта на конфокална микроскопска система Stellaris 5 с микроскоп DMi8 (Leica, Вецлар, Германия). Количественият анализ на флуоресцентния интензитет е проведен с помощта на софтуера ImageJ (версия 1.54), съгласно описания протокол (Savova et al., 2021). Експериментът е проведен в три независими повторения.

### 2.13. Колориметрично количествено определяне на триглицериди

Измерването на съдържанието на триглицериди в нематоди, на които е добавен разтвор на глюкоза в хранителната среда, е извършено с помощта на кит за количествено определяне на триглицериди (MAK266, Sigma-Aldrich). Пробоподготовката, измерването и изчисленията са извършени съгласно протокола на производителя. Получените стойности за съдържанието на триглицериди (nM) за всяка група са нормализирани спрямо групата с носител (+G) и са представени в произволни единици.

### 2.14. Изследване на митохондриална динамика

Митохондриалната функция е оценена чрез определяне на митохондриалния мембранен потенциал ( $\Delta\Psi_m$ ) с помощта на багрилото TMRE и митохондриалната маса – посредством MVG. Методологията за двойно оцветяване е базирана на адаптирани протоколи, описани от Berry et al. (2023) и Daskalaki et al. (2023), с минимални модификации.

Приготвени са концентрирани разтвори на TMRE и MVG в DMSO с начални концентрации от 100  $\mu\text{M}$  и 200  $\mu\text{M}$ . Работните разтвори са разредени в топлинно инактивирана, концентрирана култура от *E. coli* OP50, съдържаща съответните концентрации на изследвания растителен екстракт или вещества. Крайните концентрации на багрилата са 100 nM за TMRE и 4  $\mu\text{M}$  за MVG.

За всяка експериментална група са използвани най-малко 1000 синхронизирани нематоди в три повторения (стадий L4), инкубирани с багрилата за 24 часа. След приключване на оцветяването, червеите са промити внимателно с M9 буфер и оставени за 1 час върху среда, съдържаща бактерия без багрила, с цел елиминиране на остатъчното количество багрила от храносмилателния тракт.

Визуализацията е извършена с помощта на конфокална микроскопска система Stellaris 5, с обърнат микроскоп DMi8 (Leica Microsystems). Количественият анализ на флуоресцентния интензитет е проведен с помощта на софтуера ImageJ (версия 1.54), съгласно описания протокол (Berry et al., 2023).

### 2.15. Експресия и клетъчна локализация при трансгенни щамове

За визуализация на експресията и клетъчната локализация на транскрипционните фактори HLH-30, DAF-16 и SKN-1 са използвани трансгенните линии MAH240 *sqIs17*

[*p<sub>hlh-30</sub>*HLH-30::GFP + *rol-6(su1006)*], OH16024 *daf-16* [*ot971(daf-16::GFP)* I] и LD1 *ldIs7* [*SKN-1B/C::GFP* + *rol-6(su1006)*]. Всяка експериментална група съдържа синхронна популация от над 1000 нематоди в L4 стадий, предварително подложени на експериментално третиране за период от 24 часа. След това нематодите са промити с M9 буфер, анестезирани с левамизол (5 mM) и монтирани върху предметни стъкла. Флуоресцентните сигнали на GFP-белязаните щамове са визуализирани чрез Leica Stellaris 5 конфокална микроскопска система с инвертен микроскоп DMi8, при увеличение 10× или 20×.

В случаите, когато е необходима положителна контролна група, нематодите са подложени на кратък топлинен стрес (37 °C за 5 минути) непосредствено преди визуализиране за индуциране на ядрена транслокация на съответните транскрипционни фактори. Експериментът е проведен в три независими повторения.

#### 2.16. Конфокална микроскопия и анализ на данни

Конфокални флуоресцентни изображения на нематоди от всяка група са заснети на конфокалната микроскопска система Stellaris 5 с инвертен микроскоп Dmi8 от Leica. Изображенията са анализирани посредством софтуера ImageJ (версия 1.53t), като флуоресцентния сигнал се преобразува в нормализирана обща коригирана клетъчна флуоресценция (corrected total cell fluorescence, CTCF). Получените стойности са нормализирани спрямо контролната група нематоди и са представени в условни единици (arbitrary units, a.u.).

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

Изолирането на тотална РНК е извършено с фенолния реагент PureZol (#7326809, Bio-Rad) от приблизително 3000-4000 нематоди за група, в три независими повторения. Агарозна гел електрофореза и UV спектроскопия са използвани, за да се определи чистотата, интегритета и количеството на изолираната РНК. Обратната транскрипция е извършена с кит за синтез на комплементарна ДНК (cDNA) – First strand cDNA synthesis kit (Canvaх, Кордоба, Испания). Експресията на информационна РНК (иРНК) е изчислявана по метода на  $\Delta\Delta$ CT, посредством софтуера CFX Maestro software (Bio-Rad). За референтни гени са използвани гените *iscu-1* и *mdh-1*. Резултатите са нормализирани спрямо контролната група нематоди.

## 2.18. Имуноблот анализ за определяне експресията на протеини

Тотални протеинови лизати от приблизително 2500 нематоди за експериментална група са приготвени и анализирани чрез Western блот техника, подробно описана от Vasileva et al. (2021). За протеиновата екстракция е използван RIPA лизиращ буфер. Концентрацията на тоталния протеин във всяка проба е определена чрез реагент на Bradford. Еквивалентни количества от тоталния протеинов лизат са разделени посредством вертикална електрофореза с натриев додецил сулфат-полиакриламиден гел и прехвърлени на нитроцелулозни мембрани посредством Trans-Blot Turbo система за полусух трансфер (Bio-Rad). Мембраните са блокирани за 1 h на стайна температура в 5% обезмаслено мляко в Трис-буфериран физиологичен разтвор (TBS) буфер, последвано от инкубация със съответното първично антитяло за едно денонощие. За визуализиране на първичните антитела срещу таргетните протеини е извършено инкубиране с видово-специфично вторично антитяло, конюгирано с StarBright Blue 700, последвано от измерване интензитета на флуоресценция на ChemiDoc MP система за визуализация (Bio-Rad). Данните за нивата на избраните протеини са нормализирани спрямо референтен протеин ( $\beta$ -актин), посредством софтуер Image Lab 6.0.1 (Bio-Rad).

## 2.19. Статистически анализ

Статистическата обработка на данните е извършвана в SigmaPlot v11.0 от Systat Software GmbH (Еркат, Германия). Данните са представени като средна стойност  $\pm$  стандартна грешка на средната стойност (SEM),  $n$  = обозначава броя на независимите наблюдения, използвани за изчисляване на съответната средна стойност и SEM. В зависимост от типа анализ  $n$  може да съответства на общия брой нематоди използвани в три независими биологични повторения. Разликите между експерименталните групи са изчислени чрез еднопосочен анализ на дисперсията (one-way analysis of variance; ANOVA), последван от *post hoc* тест на Tukey. При разпределение на данните различно от нормално е използван ANOVA on ranks с последващ Dunn's тест, а при сравнение на две групи е прилаган Mann–Whitney Rank Sum Test. Статистически значими различия между групите се приемат тези при  $p < 0.05$ . Сравняването на преживяемостта между експерименталните групи при тестовете за устойчивост към оксидативен стрес и продължителност на живот е извършено чрез построяване на криви на Kaplan-Meier. Кривите на преживяемост на различните групи са сравнени чрез log-rank test за откриване на статистическа значимост между тях ( $p < 0.05$ ).

## V. РЕЗУЛТАТИ

Чрез етнофармакологичен подбор са селектирани природни продукти от растителен произход с потенциал за повлияване на еволюционно консервативни механизми на стареене. Обектите на изследване включват индивидуално биологично активно съединение (икариин), растителни екстракти (от листна маса от *P. granatum* и стандартизиран продукт ADAPT-232) и функционална храна (сок от плодовете на *P. granatum*).

### 1. Установяване на ефекта на икариин върху устойчивостта към стрес и продължителността на живот при *C. elegans*

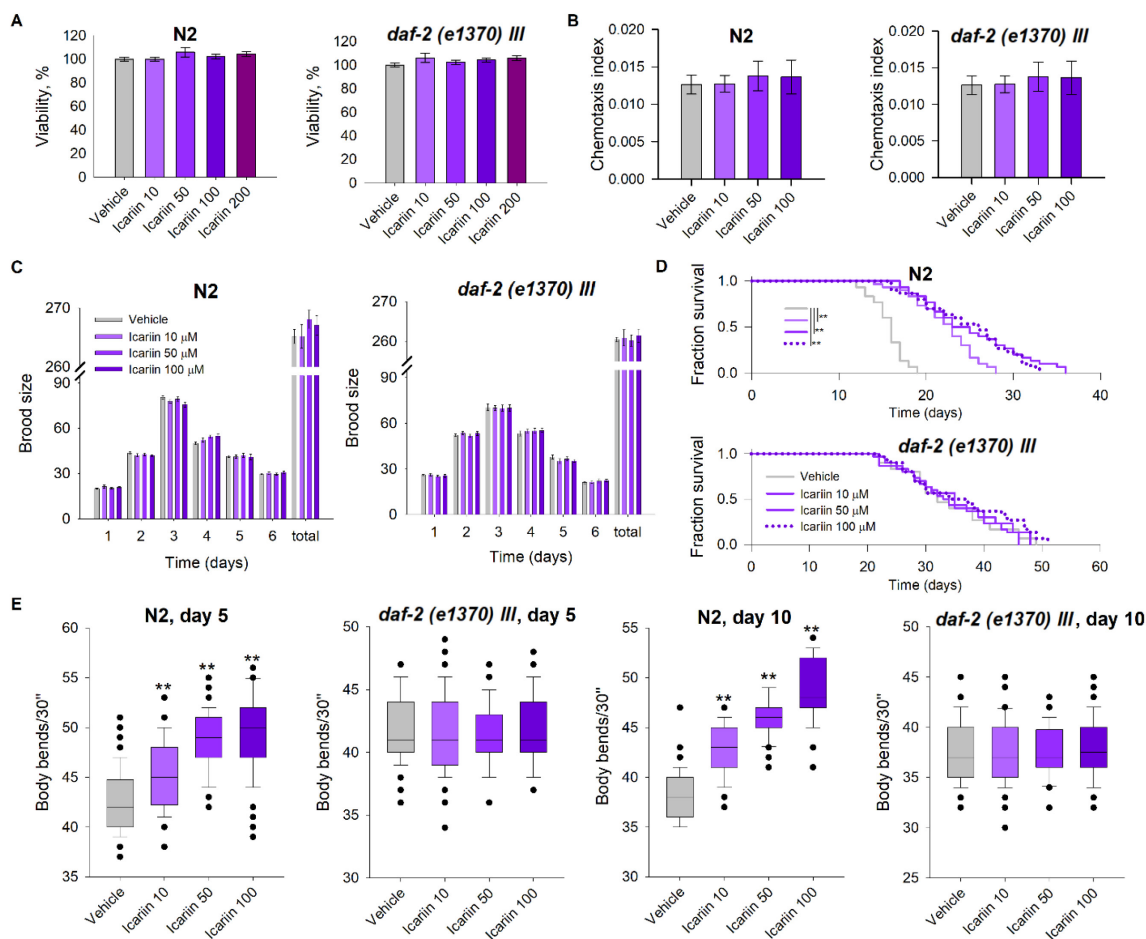
Икариин е естествено срещаш се флавоноид, който се съдържа в най-големи количества в растения от рода *Epimedium*. Редица изследвания подробно разглеждат способността му да модулира възпалителни сигнални пътища и продукцията на цитокини (El-Shitany et al., 2019; Zhang et al., 2017). Доказано е и, че икариин притежава атеропротективни и невропротективни свойства (Li L. et al., 2022; Wang et al., 2020). За разлика от тези добре документирани ефекти, потенциалната роля на икариин в процесите на стареене и дълголетие остава сравнително слабо проучена.

#### 1.1. Оценка на физиологични параметри и продължителност на живота

С цел оценка на безопасността на икариин при *C. elegans* е проведен тест за жизнеспособност (Yellurkar et al., 2021). По време на ларвните етапи (L1–L4) нематодите са инкубирани в продължение на 48 часа с различни концентрации на икариин (10–200  $\mu\text{M}$ ; Фиг. 12 А). От получените резултати е установена липса на токсичен ефект както при дивия тип (N2), така и при мутантния щам *daf-2*. Въз основа на тези данни са избрани концентрации от 10, 50 и 100  $\mu\text{M}$  за последващите анализи.

С цел оценка на потенциалното влияние на икариин върху физиологията на червеите са проведени допълнителни фенотипни тестове. Проследен е отговорът към стимул чрез анализ за хемотаксис, който предоставя информация за функционалността на невросензорната мрежа, участваща в процеси като хранителна ориентация и избягване на токсични субстанции (Queirós et al., 2021). При *C. elegans* поведението при хемотаксис се регулира от невроендокринни механизми, включващи и *daf-7* – хомолог на човешкия TGF- $\beta$ , свързан с формирането на дауер ларва (De-Souza et al., 2023).

Проведеният анализ за хемотаксис не установи значима разлика в отговора към икариин между контролните и третираните групи както при щам N2, така и при *daf-2* мутанта (Фиг. 12 В). Този резултат предполага отсъствие на ефект върху невросензорната система и потвърждава профила на безопасност на икариин в рамките на изследвания времеви интервал.



**Фигура 2.** Третирането с икариин удължава продължителността на живота, подобрява двигателната активност и поддържа физиологичната функция при див тип *C. elegans*, за разлика от мутантния щам *daf-2*. (A) Анализ на жизнеността на див тип *C. elegans* (щам N2) и мутантен щам *daf-2 (e1370) III* след третиране с икариин в концентрационен диапазон 10–200  $\mu$ M. (B) Тест за хемотаксис при нематоди от двата щама след третиране с икариин ( $n = 300$ – $600$ ). (C) Репродуктивен капацитет представен като дневен и общ брой на потомството при третиранни с икариин N2 и *daf-2* червеи ( $n = 15$ ). (D) Криви на преживяемост (Kaplan–Meier) на третиранни с икариин червеи в сравнение с контролната група ( $n = 90$ ). Статистическата значимост между кривите на преживяемост е оценена чрез Log-rank тест. (E) Двигателна активност – брой телесни

огъвания за 30 секунди на 5<sup>-ия</sup> и 10<sup>-ия</sup> ден от живота при двата щама ( $n = 45$ ). Данните от тестовите (B–E) са представени като средна стойност  $\pm$  стандартна грешка на средната (SEM). Статистическа значимост: \*\* $p < 0.01$  спрямо съответната контролна група (ANOVA).

За установяване на действието на икариин върху репродуктивния капацитет е извършена оценка на дневното и общото потомство при третиране с веществото нематоди. Репродуктивната способност се счита за важен индикатор за физиологично състояние, както и основен физиологичен белег на стареене при *C. elegans* (Spanoudakis et al., 2023). От получените резултати не е наблюдавано повлияване на фертилитета и капацитета на потомството в нито една от тестваните концентрации на икариин (Фиг. 12 C). Този резултат показва, че флаваноидният гликозид не оказва влияние върху репродуктивната функция както при дивия тип, така и при мутантния щам *daf-2*.

Прилагането на икариин води до статистически значимо удължаване на живота при дивия тип червеи (Фиг. 12 D), докато при *daf-2* мутантния щам не е отчетен подобен ефект. Тези резултати предполагат възможното участие на DAF-2/инсулин/IGF-1 сигналния път в медиацията от икариин ефект върху дълголетие.

Стареенето при *C. elegans* води до прогресивна загуба на мускулна функция и невродегенерация, съпоставими със загубата на моторна координация при хора в напреднала възраст и с невродегенеративни заболявания като болестта на Алцхаймер и Паркинсон (Sohrabi et al., 2021; Son et al., 2019). За оценка влиянието на третиране с икариин върху двигателната функция по време на стареене е отчетен броят огъвания на тялото в две времеви точки от жизнения цикъл (ден 5<sup>-и</sup> и ден 10<sup>-и</sup>).

Установено е дозозависимо подобрене на подвижността при нематоди от див тип след третиране с икариин (Фиг. 12 E). При мутантния щам *daf-2* не е отчетено значимо подобрене, което подсказва, че ефектът на икариин върху двигателната активност също е медиран от сигналния път DAF-2 и съответства на наблюдаваното удължаване на живота.

На базата на получените резултати може да се обобщи, че икариин подобрява двигателната активност и удължава продължителността на живота при червеи от див тип чрез модулация на сигналната ос DAF-2/DAF-16. Едновременно с това, не са установени токсични ефекти върху жизнеспособността, невросензорната функция или

репродуктивния капацитет на *C. elegans*, което потвърждава добрия профил на безопасност на веществото в тестваните концентрации.

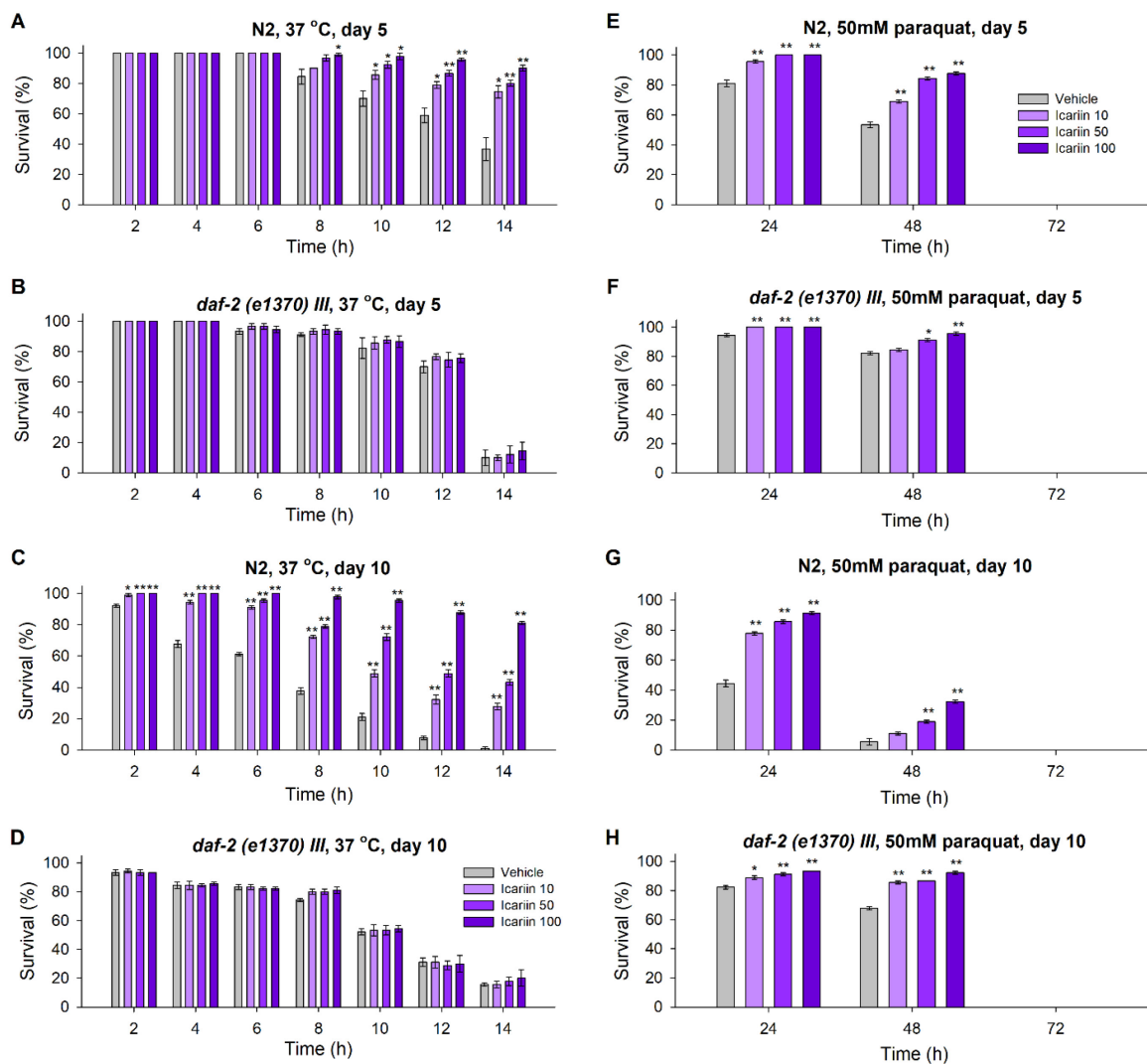
## 1.2. Повлияване устойчивостта към стрес при млади и възрастни индивиди

Удължаването на живота при *C. elegans* често е съпроводено от повишена устойчивост към стресови фактори от различен произход, като сред най-използваните методологии в този контекст са прилагането на термален и оксидативен стрес (Bao et al., 2022; Dues et al., 2016).

С цел оценка на термотолерантността, нематоди, предварително третирани с икариин, са изложени на температура от 37 °C, като преживяемостта е проследена на всеки два часа в рамките на 14 часа (Фиг. 13 A–D). Тестовете са проведени на ден 5<sup>-и</sup> и ден 10<sup>-и</sup> от живота – съответно при начални и напреднали прояви на възрастово-свързани промени. При див тип *C. elegans*, е установено значително повишаване на термотолерантността при всички изследвани концентрации на икариин (10, 50 и 100 µM; Фиг. 13 A, C). За разлика от това, при мутантния щам *daf-2*, известен с повишена базова устойчивост към стрес (Bao et al., 2022), не е отчетена промяна след третиране с икариин (Фиг. 13 B, D).

Поддържането на ефективни клетъчни механизми за антиоксидантна защита е ключов фактор за забавяне на процесите на стареене (Guo et al., 2022; Statzer et al., 2022). При *C. elegans* експозицията на прооксидантни агенти като метилвиологен води до повишено образуване на ROS, невронни увреждания и преждевременна смърт. В настоящото изследване антиоксидантният потенциал на икариин е оценен в условия на остър оксидативен стрес с метилвиологен (50 mM), като преживяемостта е проследявана на всеки 24 часа до смъртта на последния индивид (Фиг. 13 E–H).

На ден 5<sup>-и</sup>, при дивия тип, е наблюдавано дозозависимо повишаване на устойчивостта към паракват след третиране с икариин, като ефектът се запазва до 48<sup>-ия</sup> час. На ден 10<sup>-и</sup> е отчетено статистически значимо увеличение на преживяемостта на 24<sup>-ия</sup> час, докато на 48<sup>-ия</sup> час ефектът е запазен единствено при концентрации от 50 и 100 µM (Фиг. 13 E, G). При *daf-2* мутантите също е установена повишена преживяемост 24 часа след експозицията, както на ден 5<sup>-и</sup>, така и на ден 10<sup>-и</sup> (Фиг. 13 F, H), като ефектът се запазва до 48<sup>-ия</sup> час само при по-високите концентрации. Въпреки това, при всички групи е наблюдавана пълна леталност до 72<sup>-ия</sup> час, което показва, че икариин не осигурява защита срещу натрупваща във времето токсичност.



**Фигура 3. Третиране с икариин повишава устойчивостта към топлинен и оксидативен стрес при *C. elegans*.** (A, C, E, G) Див тип нематоди и (B, D, F, H) мутантен щам *daf-2* са третирани с икариин в концентрации 10, 50 и 100  $\mu\text{M}$ . (A–D) Процент на преживяемост след индуциран топлинен стрес (37 °C за 14 часа), оценен на 5<sup>-и</sup> и 10<sup>-и</sup> ден от жизнения цикъл. (E–H) Процент на преживяемост след индуциран оксидативен стрес с паракват (50 mM), приложен на 5<sup>-и</sup> и 10<sup>-и</sup> ден от жизнения цикъл. Данните са представени като процент преживяемост (Survival %) от три независими повторения  $\pm$  стандартна грешка на средната стойност (SEM), n = 90. Статистическа значимост: \*p<0.05, \*\*p<0.01 спрямо контролната група (ANOVA).

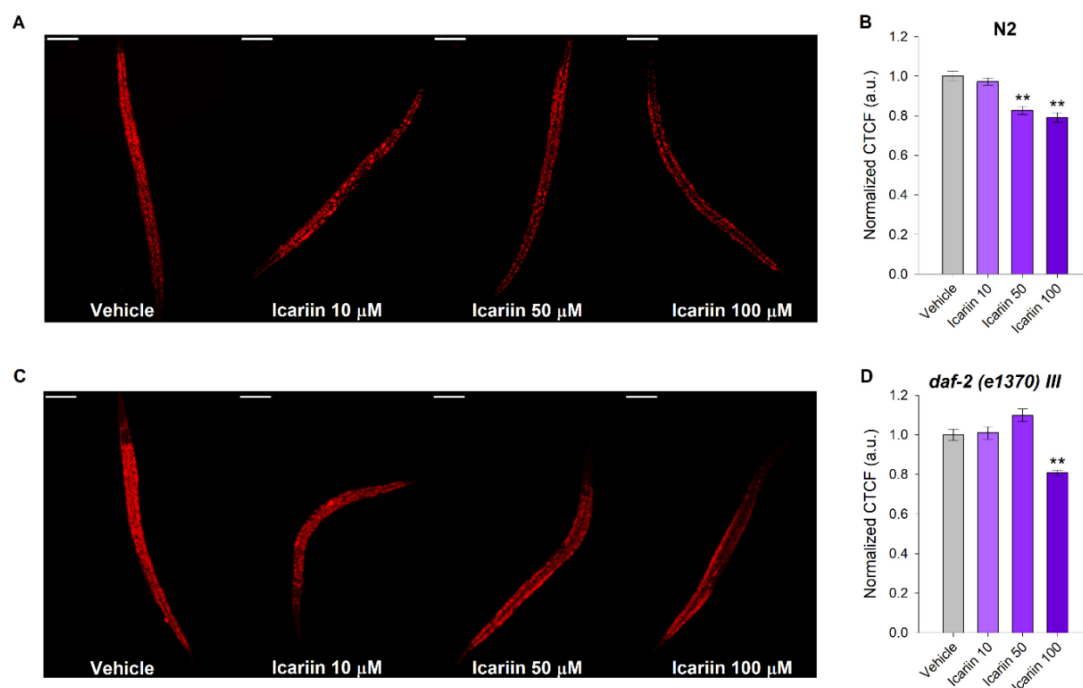
В обобщение, икариин значително повишава устойчивостта към оксидативен стрес и при двата щама, като този ефект вероятно се осъществява чрез механизъм, независим или паралелен на пътя на IIS. За разлика от това, протективният по отношение на

топлинния стрес ефект на икариин се наблюдава само при дивия тип, което предоставя доказателства за участието на IIS, предвид липсата на ефект при *daf-2* мутантите. Това предполага, че икариин активира различни защитни механизми в отговор на специфични стресови условия. Данните подкрепят хипотезата, че подобрената физиологична устойчивост, индуцирана от икариин, е съществена част от неговия положителен ефект върху състоянието на организма.

### 1.3. Изследване влиянието на икариин върху базалния метаболизъм

Редица изследвания при *C. elegans* предполагат връзка между повишената двигателна активност и увеличения енергоразход (Farias-Pereira et al., 2020; Statzer et al., 2022). В този контекст е оценено потенциалното въздействие на икариин върху базалния липиден метаболизъм при *C. elegans*.

При див тип нематоди е установено статистически значимо понижение в общото съдържание на триглицериди в концентрации 50 и 100  $\mu\text{M}$ , определено чрез Nile Red оцветяване (Фиг. 14 А, В).



**Фигура 4. Икариин модулира натрупването на липиди в базални условия.** (А, С) Представителни конфокални микроскопски изображения (увеличение 20 $\times$ , скала: 50  $\mu\text{m}$ ) на липидни натрупвания, оцветени с Nile Red, при (А) див тип N2 и (С) мутантен щам *daf-2* след 24-часово третиране с икариин в концентрации 10, 50 и 100  $\mu\text{M}$  или с носител (vehicle). (В, D) Количествено определяне на флуоресцентния сигнал чрез софтуера

ImageJ (версия 1.53t), изразено като коригирана обща клетъчна флуоресценция (CTCF), представена в условни единици (a.u.), съответно за (B) див тип и (D) *daf-2*. Данните са представени като средна стойност  $\pm$  стандартна грешка на средната (SEM),  $n = 90$ .  $p^{**} < 0.01$  спрямо контролната група (ANOVA).

При мутантния щам *daf-2*, характеризиращ се с повишено натрупване на липиди вследствие на нарушена инсулиноподобна сигнализация (Бао et al., 2022), е демонстриран липидоредуциращ отговор единствено при най-високата тествана концентрация на икариин – 100  $\mu$ M (Фиг. 14 C, D).

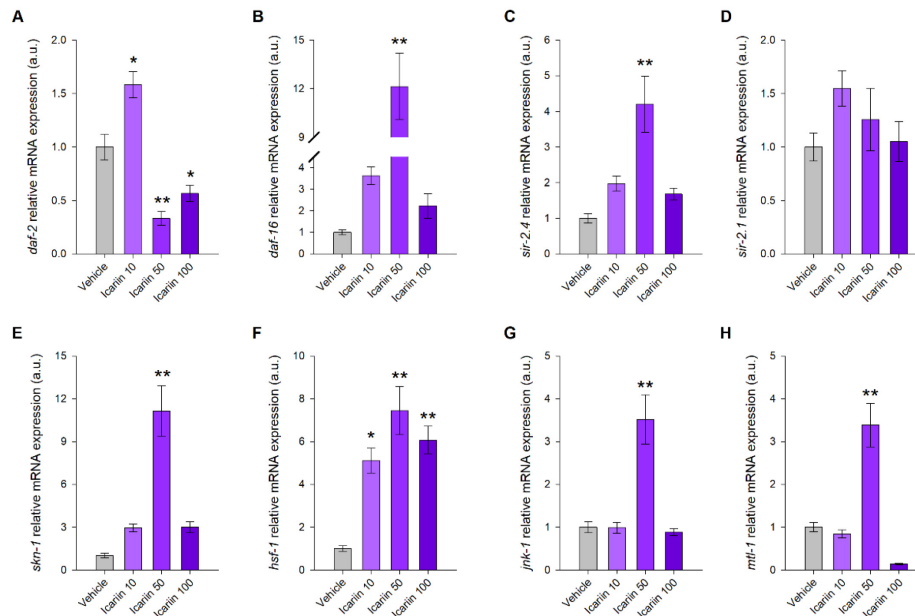
Тези резултати разкриват нова функционална характеристика на икариин като средство с потенциален липидомодулиращ ефект, чието действие е поне частично зависимо от пътя *daf-2*. В същото време, наблюдаваният отговор при див тип червеи при по-ниски концентрации предполага, че действието на икариин може да включва и допълнителни молекулярни механизми, независими от класическата инсулиноподобна сигнализация.

#### 1.4. Проследяване експресията на гени чрез RT-qPCR

С цел по-задълбочено изясняване на молекулните механизми чрез които икариин повлиява продължителността на живот, е извършен транскрипционен анализ, фокусиран върху пътя на *daf-2*/IIS, както и върху ключови еволюционно консервативни гени, участващи в регулацията на дълголетието и процеси, свързани със стресоустойчивост и метаболитна адаптация. Анализирани са нивата на експресия на *skinhead-1* (*skn-1*), *sir-2.1*, *sir-2.4* и *hsf-1* – участващи в поддържането на клетъчна хомеостаза и отговора на организма към различни стресови фактори и съответстващи на човешките NRF2, SIRT1, SIRT6 и HSF1 (Jiang et al., 2021).

Получените данни предоставят допълнителни доказателства в подкрепа на хипотезата, че икариин проявява своя биологичен ефект чрез инхибиране на *daf-2* и модулиране на IIS пътя. При прилагане на икариин в концентрации от 50  $\mu$ M и 100  $\mu$ M е наблюдавано статистически значимо потискане на експресията на *daf-2* (Фиг. 15 A), като е отчетен различен експресионен отговор при двете концентрации. При концентрация от 50  $\mu$ M потискането на *daf-2* е свързано и с повишена транскрипционна активност на *daf-16* (Фиг. 15 B) и неговия целеви ген металотионеин (*mtl-1*, Фиг. 15 H), както и с активиране на jun N-terminal kinase (*jnk-1*; Фиг. 15 G), който е добре проучен

модулятор на DAF-16 в условия на клетъчен стрес (Мао et al., 2018). Едновременно с това е отчетено повишаване на експресията на *skn-1* (Фиг. 15 E) и *hsf-1* (Фиг. 15 F), които функционират паралелно с *daf-16* и допринасят за дълголетие чрез независими регулаторни пътища (Zhang et al., 2021). Повишената експресия на *sir-2.4* след третиране с 50  $\mu$ M икариин (Фиг. 15 C), но не и *sir-2.1* (Фиг. 15 D), също предполага специфично участие на този сиртуин в механизма на действие на съединението.



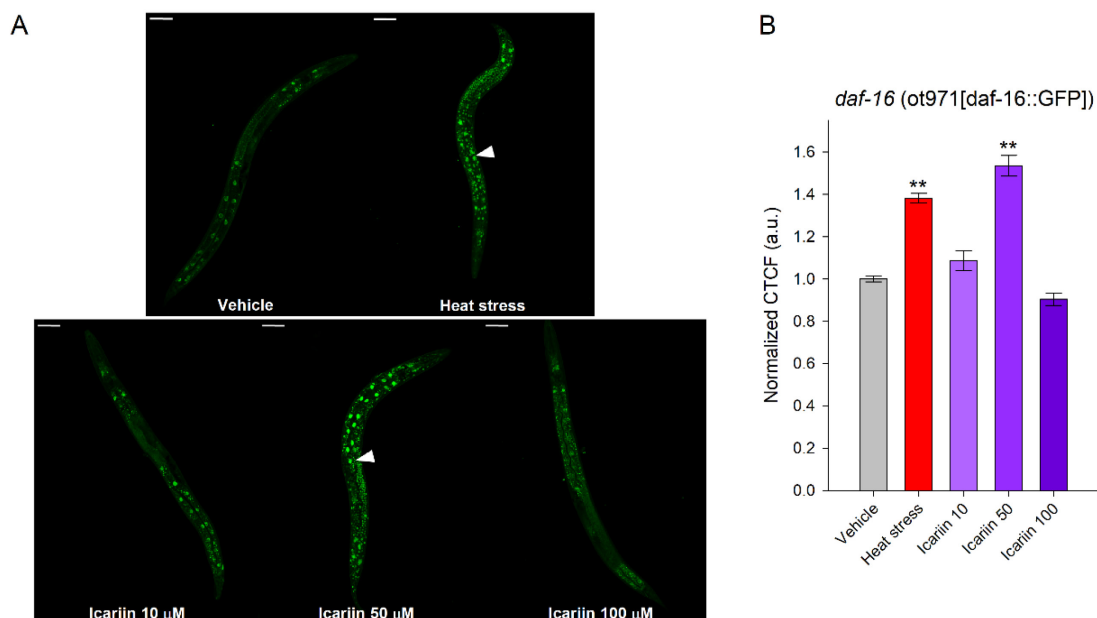
**Фигура 5. Икариин модулира експресията на гени, участващи в еволюционно консервативни сигнални пътища, асоциирани с дълголетие при *C. elegans*.** Генна експресия на (A) *daf-2*, (B) *daf-16*, (C) *sir-2.4*, (D) *sir-2.1*, (E) *skn-1*, (F) *hsf-1*, (G) *jnk-1* и (H) *mtl-1* след третиране с икариин в концентрации от 10, 50 и 100  $\mu$ M. Данните са представени в условни единици (a.u.), като средна стойност  $\pm$  SEM, n = 9, p\* < 0.0, p\*\* < 0.01 спрямо контролната група (ANOVA).

При по-високата концентрация от 100  $\mu$ M е наблюдавано значително повишаване единствено в експресията на *hsf-1* (Фиг. 15 E), без съществени промени в нивата на останалите анализирани гени. Този резултат предполага, че при по-високи дози икариин може да предизвикват по-насочена и ограничена транскрипционна активация, при която специфични защитни пътища, като този, регулиран от *hsf-1*, се активират селективно. Това от своя страна е индикация за наличие на дозозависим праг, при който различни концентрации модулират различни молекулярни мрежи.

Обобщено, резултатите от генната експресия показват, че *hsf-1* е единственият регулатор, активиран при всички тествани концентрации на икариин. При 50  $\mu\text{M}$  обаче се наблюдава модулация на по-широк набор от гени, включително *daf-2* и *daf-16*, което предполага по-комплексен защитен отговор. При 100  $\mu\text{M}$  регулацията се стеснява главно до *hsf-1*, което отразява по-специфично, зависимо от дозата действие. Тези данни потвърждават, че различните концентрации на икариин модулират различно молекулярните механизми, участващи в дълголетие и клетъчната устойчивост.

### 1.5. Анализ на динамиката и субклетъчната локализация на DAF-16

Въз основа на резултатите от анализа на генна експресия и ключовата роля на DAF-16 в регулацията на стареенето и дълголетие, е изследвано влиянието на икариин върху субклетъчната локализация на транскрипционния фактор. За тази цел е използван трансгенният щам *daf-16(ot971[daf-16::GFP])*, който позволява директно наблюдение на ядрената транслокация на DAF-16. При третиране с икариин (50  $\mu\text{M}$ ) е установена повишена ядрена транслокация на DAF-16::GFP спрямо контролната група, потвърдена от микроскопските флуоресцентни изображения (Фиг. 16 А, В). Тези данни са в пълно съответствие с резултатите от транскрипционния анализ (Фиг. 16 В) и допълнително подкрепят заключението, че ефектът на икариин при 50  $\mu\text{M}$  се медира, поне частично, от DAF-16.



**Фигура 6. Икариин индуцира ядрена транслокация на DAF-16.** (А) Представителни флуоресцентни конфокални микроскопски изображения при увеличение 20 $\times$  (скала: 50

µm) на контролна група, подложени на топлинен стрес (37 °C за 5 минути) или третирани с икариин нематоди. Стрелките обозначават повишена ядрена локализация на DAF-16::GFP. (B) Количествено определяне на флуоресцентния сигнал чрез софтуера ImageJ (версия 1.53t), изразено като коригирана обща клетъчна флуоресценция (CTCF), представена в условни единици (a.u.). Данните са представени като средна стойност ± SEM, n = 60, \*\*p<0.01 (ANOVA) спрямо групата с носител (Vehicle).

## 2. Метаболитно профилиране и изследване потенциала на екстракт от листа на *P. granatum* да модулира процесите на стареене

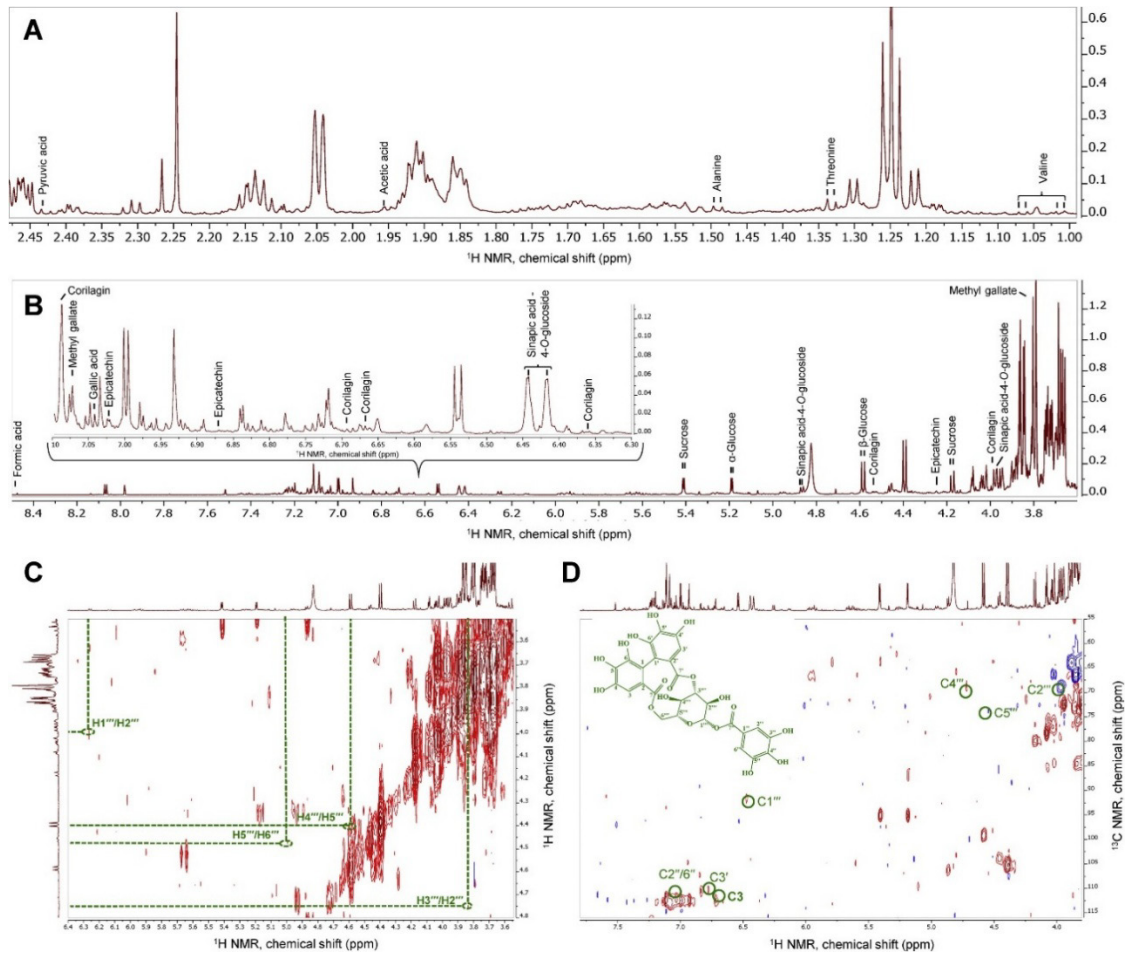
Листата на нара представляват неядлив растителен страничен продукт, характеризиращ се с високо съдържание и разнообразие от вторични метаболити. Техният богат фитохимичен профил ги определя като ценен източник на биологично активни вещества. Сред най-характерните съединения, идентифицирани в екстрактите от листа на нар, са флавоноли, флавони и танини (Machado et al., 2022). Листата на *P. granatum* се очертават като обещаващи за терапевтична регулация на метаболитните процеси, но са слабо изследвани в контекста на потенциала им да модулират процесите на стареене (Chattopadhyay and Thirumurugan, 2018; Maphetu et al., 2022).

### 2.1 Метаболитно профилиране чрез ЯМР спектроскопия

Метаболитното профилиране на получения екстракт от PGL е извършено чрез сравнение на получените протонен и двумерни ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  хомоядрена корелационна спектроскопия, COSY и  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  хетероядрена корелация с едноквантова кохерентност, HSQC) спектри с литературни данни (Georgiev et al., 2015; Sudjaroen et al., 2012; Wolfender et al., 2013). Основни първични, както и някои характерни вторични метаболити като епикатехин, метил галат и корилагин, чиито сигнали се наблюдават в протонния спектър на PGL са представени в Таблица 3 и обозначени във Фиг. 17 А.

Присъствието на корилагин е потвърдено и чрез сравнение на регистрираните  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY и  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC двумерни спектри на екстракта от PGL с данни от литературата (Sudjaroen et al., 2012). Корелацията между протоните в глюкозния остатък на корилагин се наблюдава в COSY спектър на PGL (Фиг. 17 С). В хетероядрения двумерен спектър (HSQC, Фиг. 17 D) се наблюдават пресечни пикове между  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ , съответстващи на сигнали от трите ароматни пръстена в структурата на съединението, както следва: C3 ( $\delta_{\text{H}}$  6.68- $\delta_{\text{C}}$  109.81), C3' ( $\delta_{\text{H}}$  6.71- $\delta_{\text{C}}$  107.88) и C2'' и C6'' ( $\delta_{\text{H}}$  7.06- $\delta_{\text{C}}$  110.09). Пресечни

пикове за  $\alpha$ -D-глюкозния остатък също са наблюдавани в HSQC спектъра, а именно: за C-2''' ( $\delta_H$  3.99- $\delta_C$  69.59), C-4''' ( $\delta_H$  4.6- $\delta_C$  69.59), C-5''' ( $\delta_H$  4.55- $\delta_C$  75.54) и за аномерния въглероден атом C1''' ( $\delta_H$  6.48- $\delta_C$  94.14).

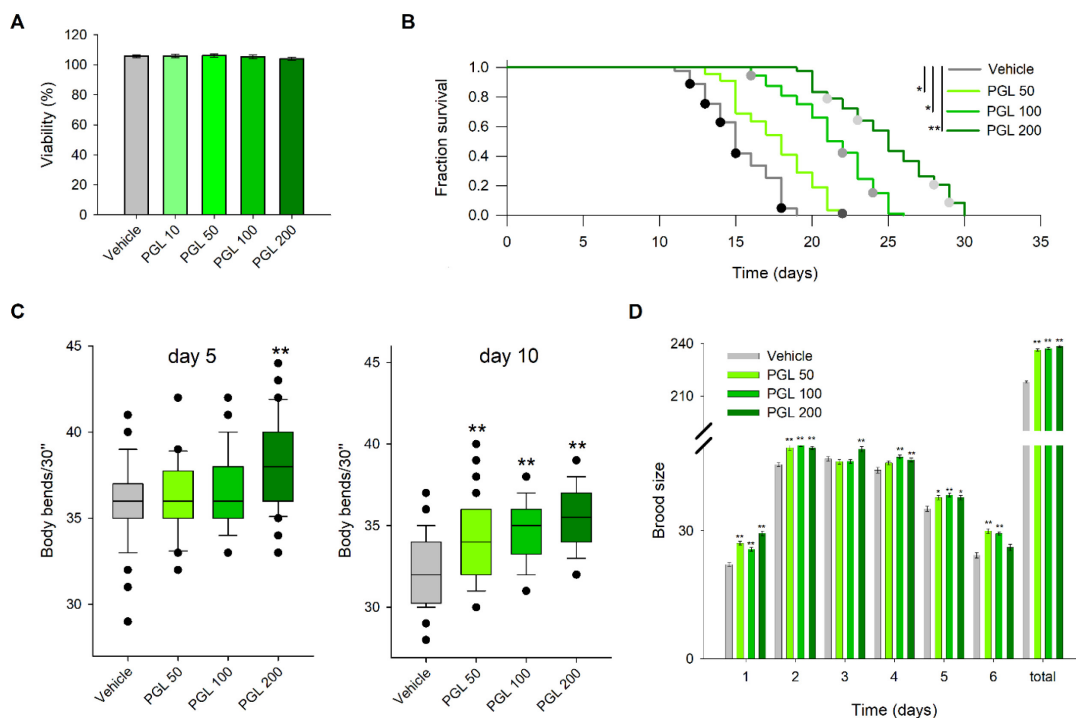


**Фигура 7.** Представителни ЯМР спектри на екстракт от листа на нар (PGL). Обозначение на сигналите на идентифицираните метаболити в протонния спектър след увеличение в съответните региони (A)  $\delta$  1–2.5 ppm, и (B)  $\delta$  3.6–8.5 ppm. Приближение на двумерните спектри – (C) COSY и (D) HSQC.

## 2.2 Анализ на продължителността на живот и фенотипни показатели

Преди да бъде оценен ефектът на екстракта от листна маса на *P. granatum* върху продължителността на живот, е извършено изследване на неговата безопасност чрез тест за жизнеспособност при *C. elegans*. Екстрактът е приложен в концентрации от 10 до 200  $\mu\text{g/mL}$  за период от 48 часа по време на ларвните етапи (L1–L4), като не е отчетена

токсичност (Фиг. 18 А). Въз основа на тези резултати са избрани концентрации от 50, 100 и 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  за последващи експерименти.



**Фигура 8. Екстрактът от листа на нар (PGL) удължава продължителността на живот, подобрява подвижността и увеличава плодовитостта при див тип *C. elegans*.** (А) Тест за жизнеспособност след третиране с PGL в концентрации от 10 до 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . (В) Продължителност на живот на нематоди, третирани с PGL в концентрации 50, 100 и 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Сравнението на продължителността на живот между групите, третирани с PGL екстракт и контролната група е извършено чрез Kaplan-Meier крива на преживяемост, представена като фракция на оцеляване ( $n = 90$ ). Статистическата значимост на кривите на преживяемост е определена с Log-rank тест. (С) Двигателна активност – брой телесни огъвания за 30 секунди на 5<sup>-и</sup> и 10<sup>-и</sup> ден от живота ( $n = 45$ ). (D) Репродуктивен капацитет – дневен и общ брой на потомството на нематоди, третирани с PGL ( $n = 15$ ). Данните за В, С и D са представени като средна стойност  $\pm$  стандартна грешка на средната (SEM). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  спрямо контролната група (ANOVA).

От оценката на екстракта върху продължителността на живот, е установено че третирането с PGL (50, 100 and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) води до статистически значимо удължаване на продължителността на живота при дивия тип *C. elegans* (N2), при което е наблюдаван дозозависим ефект (Фиг. 18 В).

Двигателната активност е оценена чрез измерване на огъването на тялото на червеите на ден 5<sup>ти</sup> и ден 10<sup>ти</sup> от жизнения им цикъл. Установено е, че екстрактът значително подобрява двигателната активност и в двете изследвани времеви точки в сравнение с контролната група (Фиг. 18 С).

За допълнителна оценка на физиологичното състояние е изследван репродуктивният капацитет чрез отчитане на дневния и общия размер на потомството. Установено е, че третирането с екстракта значително увеличава фертилността в сравнение с контролната група (Фиг. 18 D).

Обобщено, данните от фенотипните анализи и продължителността на живот демонстрират, че PGL притежава потенциал за подобряване на здравословната продължителност на живота чрез забавяне на функционалния упадък, свързан със стареенето, увеличаване на репродуктивния капацитет и поддържане на двигателната активност при *C. elegans*.

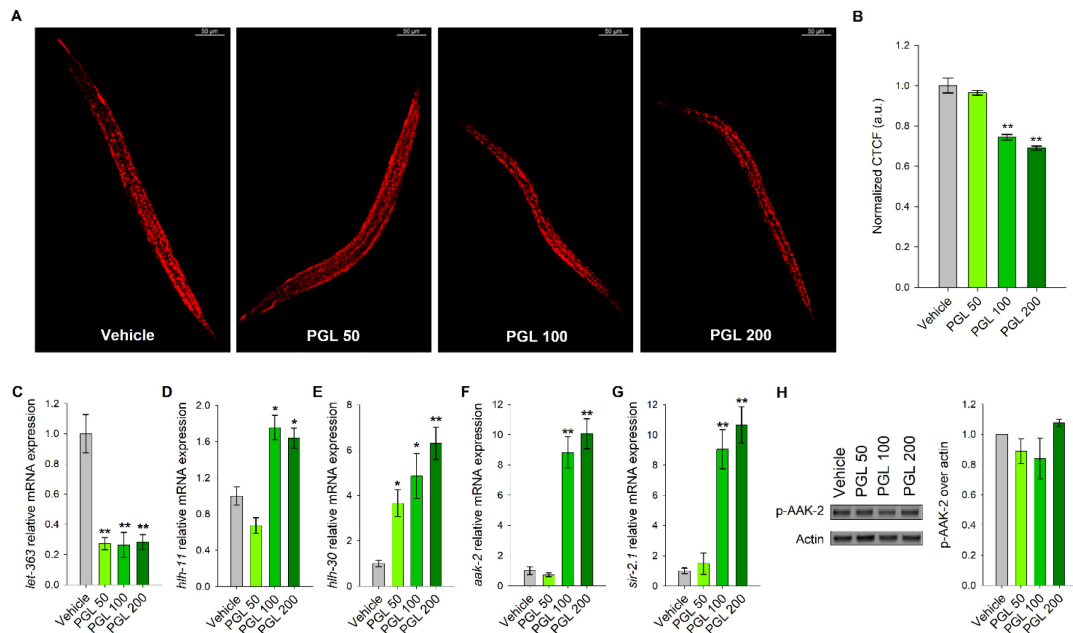
### 2.3 Изследване на липидната хомеостаза и установяване ролята на ключови метаболитни сензори в механизма на действие

За изследване на ефекта на третиране с PGL да модулира метаболитните процеси в организма, е проведена оценка върху базалния липиден метаболизъм. При третиране с PGL в концентрации от 100 и 200 µg/mL е отчетено значително намаляване в нивата на липиди спрямо контролната група (Фиг. 19 А, В). За изследване механизмите зад наблюдавания ефект е проведен транскрипционен анализ, от който е установено, че третиране с PGL в концентрации 100 и 200 µg/mL води до значително повишаване в експресията на гените *hlh-11* (Фиг. 19 D), *aak-2* (Фиг. 19 F) и *sir-2.1* (Фиг. 19 G), което предполага активиране на ключови пътища, свързани с енергийния метаболизъм и по-конкретно окисление на липидите.

С цел проследяване ролята на АМРК в механизма на действие на PGL, е извършен имуноблот анализ на определяне нивата на фосфорилираната форма на протеина (рАМРК). При получените резултати не е установена съществена разлика в степента на фосфорилиране спрямо контролната група (Фиг. 19 H), което предполага, че наблюдаваната регулация върху липидния метаболизъм е по-скоро резултат от транскрипционната регулация, отколкото от посттранслационна активация на АМРК.

Интригуващ е фактът, че при всички изследвани концентрации на PGL е отчетена статистически значима индукция в експресията на *hlh-30* (Фиг. 19 E), хомолог на TFEB

при човека, който е ключов транскрипционен фактор, участващ в регулацията на лизозомната биогенеза, автофагията и метаболитната адаптация. Паралелно с това е наблюдавано потискане на експресията на *let-363* (Фиг. 19 С), тоест инхибиране на mTOR сигнализацията, което пряко кореспондира на наблюдаваните ефекти върху метаболизма и клетъчната устойчивост.



**Фигура 9. Регулация на липидното натрупване и метаболитната хомеостаза при прилагане на екстракт от листа на нар (PGL).** (A) Представителни конфокални микроскопски изображения при увеличение 20× (скала: 50 μm), оцветяване с Nile Red на липидни депа в нематоди от див тип (N2), третирани с PGL екстракт в концентрации 50, 100, 200 μg/mL или с носител 0.2% DMSO (vehicle). (B) Количествен анализ на липидното натрупване, изразено като коригирана обща клетъчна флуоресценция (CTCF), нормализирана спрямо контролната група (n = 90). Нормализирана гена експресия на (C) *let-363*, (D) *hlh-11*, (E) *hlh-30*, (F) *aak-2* и (G) *sir-2.1* след третиране с носител или PGL (n = 9) с референтни гени *iscu-1* и *mdh-1*. (H) Представително изображение от имуноблот анализ на фосфорилираната форма на ААК-2 (pAMPK) и нормализираната експресия спрямо актин като референтен протеин (n = 3). Стойностите са представени в условни единици (a.u.) като средна стойност ± стандартна грешка на средната (SEM) \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 спрямо групата с носител (ANOVA).

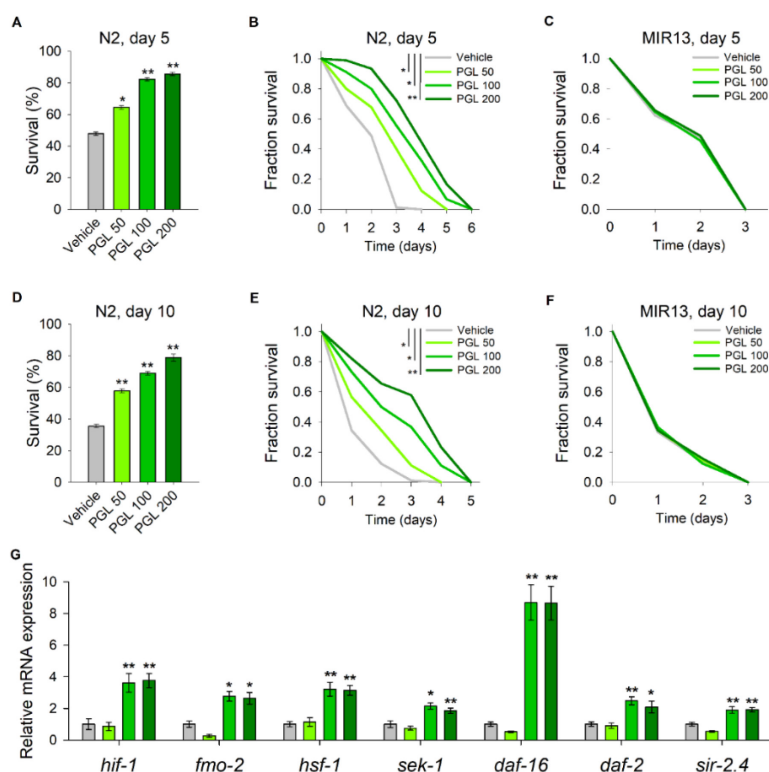
В обобщение, резултатите демонстрират, че PGL модулира липидния метаболизъм и подпомага здравословното стареене чрез активация на транскрипционни фактори като *hlh-30* и *hlh-11*, както и чрез въздействие върху пътищата на AMPK и mTOR.

## 2.4 Проследяване на ефекта на PGL върху стресовия отговор и асоциираните с него сигнални пътища

За установяване на потенциала на PGL да модулира устойчивостта към стрес, е извършена оценка на преживяемостта на млади (ден 5) и възрастни (ден 10) нематоди, подложени на остър топлинен или оксидативен стрес.

От получените резултати е установено, че третирането с PGL води до концентрационно-зависимо повишаване на преживяемостта на дивия тип нематоди след 20-часов период на възстановяване от топлинен стрес (37 °C за 2 часа) както на ден 5<sup>-и</sup> (Фиг. 20 A), така и на ден 10<sup>-и</sup> (Фиг. 20 D). Подобен ефект се наблюдава и при излагане на остър оксидативен стрес, индуциран от добавяне на 50 mM метилвиологен към хранителната среда – увеличена преживяемост както на ден 5<sup>-и</sup> (Фиг. 20 B), така и на ден 10<sup>-и</sup> (Фиг. 20 E), сравнено с групата с носител.

За изясняване на молекулярните механизми, свързани с повишената устойчивост към стрес, е проведен транскрипционен анализ на панел от гени, ключови регулатори на стресовия отговор и дълголетието, включително *daf-16*, *daf-2*, *sir-2.4*, *hif-1*, флавин-съдържаща монооксигеназа 2 (*fmo-2*), *hsf-1* и двойно специфична митоген-активирана протеин киназа киназа *sek-1* (Фиг. 20 G).



**Фигура 10.** Третирането с екстракт от листа на нар (PGL) повишава устойчивостта към стрес чрез активиране на широк спектър от свързани със стресовият отговор

**механизми.** (A, B, D, E) Нематоди от див тип N2 и (C, F) двойномутантен щам MIR13 [*sir-2.1(ok434) IV; aak-2(ok524) X*] са третирани с екстракт от PGL в концентрации 50, 100 и 200 µg/mL или с 0.2% DMSO носител (vehicle). (A, D) Оценка на преживяемостта след излагане на остър топлинен стрес (37 °C за 2 часа), последван от 20-часов период на възстановяване при стандартни условия на ден 5 и ден 10 от жизнения цикъл на N2. Резултатите са представени като процент преживяемост, изразен като средна стойност ± SEM, n = 90, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 (ANOVA). Криви на преживяемост при индукция на оксидативен стрес с метилвиологен (50 mM), измерени на интервали от 24 часа при (B, E) N2 нематоди и при (C, F) мутантен щам MIR13, дефицитен на гените *sir-2.1* и *aak-2* (n=90). Статистическата значимост е изчислена чрез log-rank тест. (G) Нормализирана относителна експресия на гени, свързани със стресовия отговор – *hif-1*, *fmo-2*, *hsf-1*, *sek-1*, *daf-16*, *daf-2* и *sir-2.4* – след третиране с екстракт от PGL в сравнение с контролна група. Данните са представени като средна стойност ± SEM, n = 9, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 (ANOVA).

Установено е, че третиране с PGL в концентрации от 100 и 200 µg/mL води до статистически значимо повишаване на експресията на *hsf-1* (Фиг. 20 G) – централен медиатор на отговора към топлинен стрес, както и на *fmo-2* (Фиг. 20 G), чиято активация е асоциирана с удължаване на живота в условия на диетично ограничение (Choi et al., 2023; Tuckowski et al., 2025). Наблюдава се също и индукция в експресията на *daf-16*, *sir-2.4* и *daf-2* (Фиг. 20 G), което потвърждава участието на инсулин/IGF-1 сигналния път в механизма на действие. Повишената транскрипционна активност на *sek-1* (Фиг. 20 G), ортолог на МКК3/6 и компонент от p38 MAPK каскадата, предполага активиране на механизми, свързани с вродения имунитет (Huang et al., 2023).

Предвид установеното редуциране на липидното натрупване, е изследвана възможността повишената устойчивост към стрес да се дължи на метаболитна регулация. За целта е използван двойномутантен щам MIR13, при който липсва функционалност на гените *aak-2*/AMPK и *sir-2.1*/SIRT1. При тази генетична конфигурация не се наблюдава повишаване на устойчивостта към оксидативен стрес след третиране с PGL, както на ден 5<sup>-и</sup>, така и на ден 10<sup>-и</sup> от жизнения цикъл (Фиг. 20 C,F). Това показва, че протективният ефект на екстракта по отношение на приложения оксидативен стрес е зависим от активността на ААК-2 и SIR-2.1.

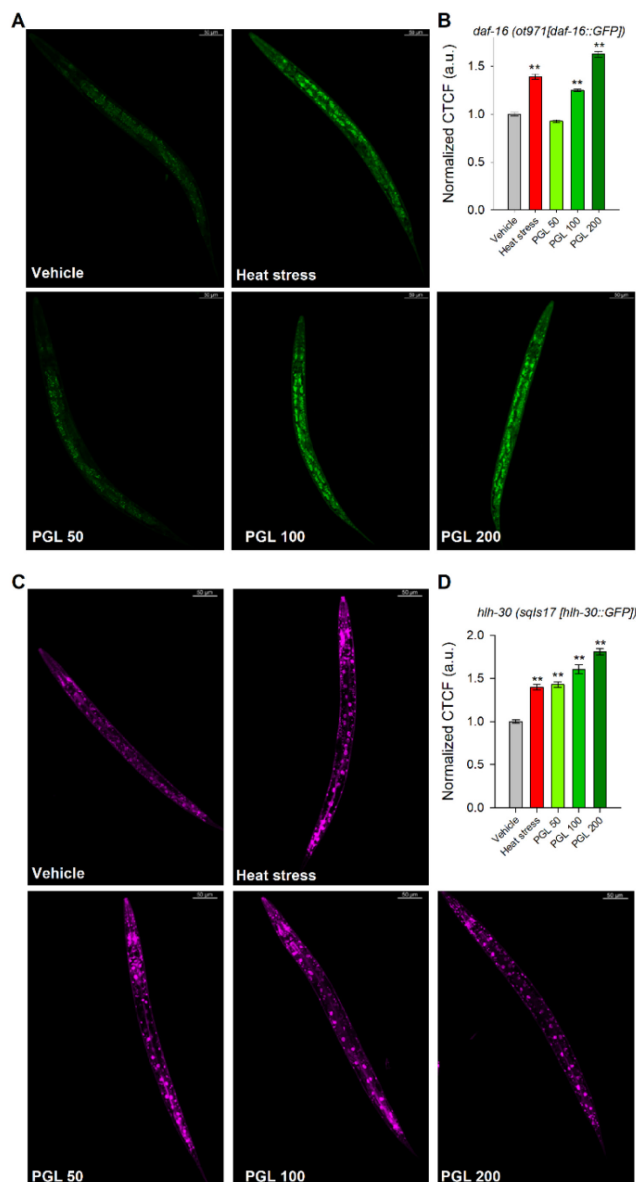
Получените резултати ясно демонстрират, че PGL подпомага здравословното стареене на *C. elegans* чрез повишаване на устойчивост към термичен и оксидативен стрес. Ефектът е съпроводен от регулация на гени, свързани със стресовия отговор и дълголетие – *daf-16*, *hsf-1*, *sir-2.4*, *sek-1*, *fmo-2* и *hif-1*, както и от активиране на метаболитни сензорни пътища като *aak-2* и *sir-2.1*.

2.5 Установяване ролята на HLH-30/TFEB и DAF-16/FOXO в механизма на действие  
Транскрипционният фактор HLH-30, ортолог на човешкия TFEB, представлява основен регулатор на автофагията, лизозомната биогенеза и метаболитната адаптация, като неговата повишена активност се асоциира с удължен живот и подобрена клетъчна хомеостаза (Lin et al., 2018; Possik et al., 2023).

В настоящото изследване е установено, че третирането с PGL води до активиране на HLH-30, потвърдено чрез повишена флуоресценция в трансгенния щам HLH-30::GFP (Фиг. 21 C, D). Този резултат е в съответствие с регистрираното увеличаване на експресията на *hlh-30* на транскрипционно ниво (Фиг. 19 E) и подкрепя хипотезата, че HLH-30 участва като ключов медиатор в ефекта на PGL върху здравословното остаряване.

Транскрипционният фактор DAF-16 изпълнява централна роля в регулацията на дълголетие, устойчивостта към стрес и метаболитната хомеостаза (Nam et al., 2024; Sen et al., 2020). При третиране с екстракт от PGL в концентрации от 100 и 200 µg/mL е наблюдавано статистически значимо повишаване на експресията на гена *daf-16* (Фиг. 20 G). За функционално потвърждение на този ефект е използван флуоресцентно белязан репортерен щам, експресиращ DAF-16::GFP. Данните от флуоресцентната визуализация демонстрират засилена ядрена транслокация на DAF-16 при третираните нематоди, в сравнение с контролната група (Фиг. 21 A, B), което потвърждава неговата активация и участие в протективния ефект на PGL върху здравословната продължителност на живота.

Тези резултати подкрепят хипотезата, че PGL модулира еволюционно консервативни сигнални пътища, свързани с поддържането както с процеса на автофагия, така и с адаптивния отговор към стрес. Активирането на транскрипционни фактори като HLH-30/TFEB и DAF-16/FOXO очертава молекулярна рамка, чрез която се реализира потенциалът на PGL като естествен регулатор на здравословното остаряване и дълголетие.



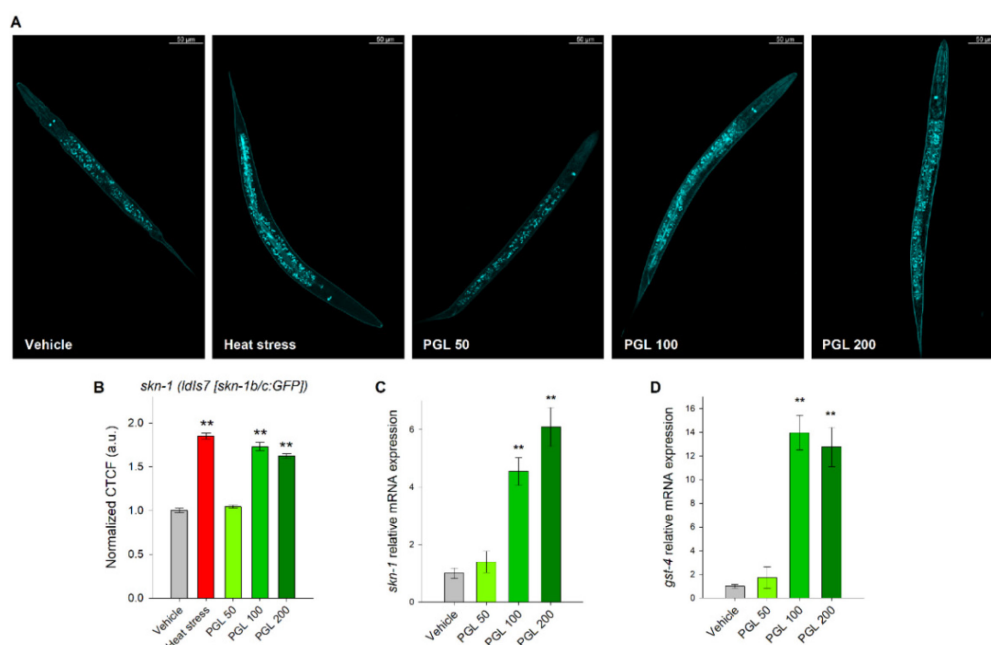
**Фигура 11.** Влияние на екстракт от листа от нар (PGL) върху ядрената локализация на HLH-30 и DAF-16 (A, C) Представителни флуоресцентни конфокални микроскопски изображения при увеличение 20× (скала 50 μm) на нематоди, третирани с носител, подложени на топлинен стрес (37 °C за 5 мин) или третирани с екстракт от PGL (50, 100 и 200 μg/mL) – за шамовете OH16024 *daf-16* [*ot971(daf-16::GFP)*] и MАН240 *sqIs17* [*hlh-30p::hlh-30::GFP* + *rol-6(su1006)*]. (B, D) Коригирана обща клетъчна флуоресценция (CTCF), нормализирана спрямо контролната група и представена в условни единици (a.u.). Данните са представени като средна стойност ± SEM, n = 60, \*\*p < 0.01 спрямо контролата (ANOVA).

## 2.6 Изследване участието на SKN-1/NRF2 в механизма на действие на PGL

Транскрипционният фактор NRF2 и неговият ортолог при *C. elegans* – SKN-1, са ключови медиатори на редокс хомеостазата и играят централна роля в адаптивния клетъчен отговор към оксидативен стрес (Banse et al., 2024; Thomas et al., 2023). С цел да се изясни дали SKN-1 участва в механизма на действие на екстракта от листа на нар, е извършена оценка при GFP-белязан трансгенен щам LD1 (*skn-1::GFP*). Установено е значително увеличаване на ядрената локализация на SKN-1::GFP (Фиг. 22 А, В), което е индикация за активация на SKN-1-зависимата сигнализация.

За потвърждение на тези наблюдения е извършен анализ на транскрипционно ниво, който демонстрира статистически значимо повишаване в експресия на *skn-1* (Фиг. 22 С), както и на неговия добре охарактеризиран таргетен ген *gst-4*, който служи като маркер за SKN-1-медиран клетъчен отговор (Фиг. 22 D).

Резултатите от анализа на ниво генна експресия и субклетъчната локализация на транскрипционните фактори SKN-1, HLH-30 и DAF-16, ясно сочат към тяхно функционално взаимодействие. Наблюдаваната синхронна активация на тези еволюционно консервативни регулатори на дълголетието подкрепя хипотезата за мултимодален механизъм на действие, чрез който PGL модулира устойчивостта към стрес и опосредства удължената продължителност на живота при *C. elegans*.



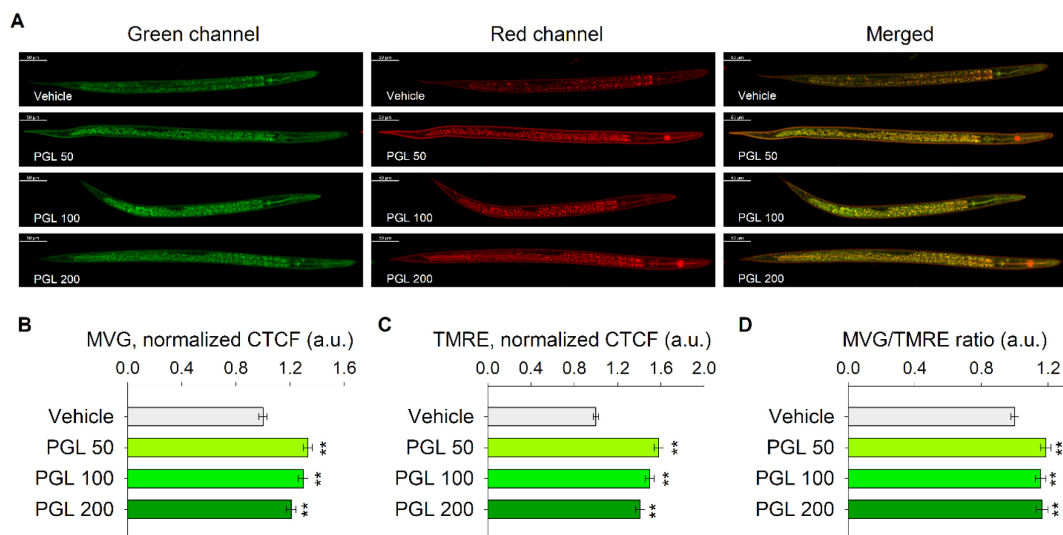
**Фигура 12.** Влияние на екстракт от листа на нар (PGL) върху субклетъчната локализация на SKN-1, експресията на *skn-1* и *gst-4*. (А) Представителни конфокални флуоресцентни микроскопски изображения при увеличение 20× (скала: 50 μm) на

нематоди LD1 *ldIs7* [*skn-1b/c::GFP* + *rol-6(su1006)*], третирани с носител (0.2% DMSO), положителна контрола подложена на топлинен стрес (37 °C за 5 мин) или третирани с PGL (50, 100 и 200 µg/mL). (B) Коригирана обща клетъчна флуоресценция, нормализирана (CTCF) спрямо групата с носител (n = 60). Относителна генна експресия на (C) *skn-1<sub>2</sub>* и (D) *gst-4* (n = 9). Данните са представени в условни единици (a.u.) като средна стойност ± SEM \*p<0.05 и \*\*p<0.01 спрямо групата с носител (ANOVA).

## 2.7 Оценка ефекта на третиране с PGL върху митохондриалния интегритет

С напредването на възрастта при редица организми се наблюдава редуциран митохондриалния интегритет, изразяващ се в нарушена митохондриална биогенеза, повишено натрупване на увреждания и намален трансмембранен потенциал ( $\Delta\Psi_m$ ). Поддържането на балансирана митохондриална маса и стабилен  $\Delta\Psi_m$  се разглежда като ключов молекулен маркер на клетъчното здраве и дълголетие (Tyshkovskiy et al., 2023).

За изследване на ефекта на екстракта от листна маса от нар върху митохондриалния статус, са приложени функционални анализи с флуоресцентни багрила – TMRE и MVG. Резултатите разкриват, че третирането с PGL води до дозозависимо повишаване на митохондриалната маса (Фиг. 23 А, В), както и до значително увеличение на  $\Delta\Psi_m$  (Фиг. 23 А, С) спрямо контролната група.



**Фигура 13. Влияние на екстракт от листа на нар (PGL) върху митохондриалния интегритет и динамика.** (A) Представителни конфокални флуоресцентни микроснимки при увеличение 20× (скала: 50 µm) в зелен и червен канал, както и обединено от двата канала (merged) изображение на *C. elegans*, третирани с 0.2% DMSO носител (vehicle) или PGL (50, 100 и 200 µg/mL), оцветени с MVG (индикатор за

митохондриална маса) и TMRE (индикатор за мембранен потенциал). Коригирана обща клетъчна флуоресценция (CTCF), нормализирана спрямо контролната група за (B) MVG, и (C) TMRE. (D) Съотношение TMRE/MVG, демонстриращо повишен митохондриален мембранен потенциал спрямо митохондриалната маса в отговор на третиране с PGL. Данните нормализирани към групата третирана с носител, представени са в условни единици (а.у.) като средна стойност  $\pm$  SEM,  $n = 60$ ,  $**p < 0.01$  спрямо контролната група (ANOVA).

Установените ефекти върху митохондриалната функция са в съответствие с предходните наблюдения за повишена експресия на *hlh-30*/TEFB и потискане на *let-363*/mTOR (Фиг. 19 C, E), което подкрепя хипотезата за тяхното участие в регулирането на митохондриалния интегритет и биогебеза, медиирани от екстракта.

Получените данни подчертават потенциала на PGL да упражнява протективно действие върху митохондриалната мрежа, като по този начин допринася за поддържане на клетъчната енергийна хомеостаза при условия на стареене.

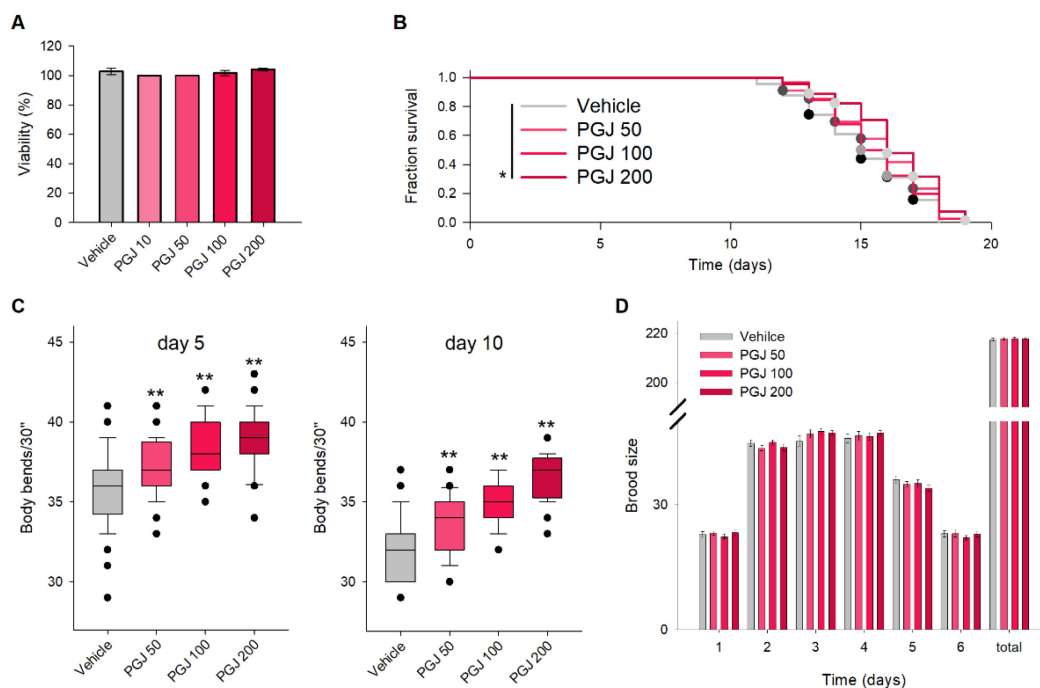
### 3. Оценка на потенциала на сок от *P. granatum* като функционална храна с геропротективен ефект

Плодовете на нара са използван като „лечебна храна“ в множество култури и традиционни медицински практики за лечение на инфекции, понижаване на температурата, както и при язвени заболявания, диария, афти, ацидоза, хеморагии, дизентерия и респираторни патологии (Marhetu et al., 2022). Благодарение на богатото съдържание на вторични метаболити, сокът от нар проявява широк спектър от фармакологични ефекти, включително противовъзпалителен и невропротективен (Bahari et al., 2023; Moradnia et al., 2024). Освен това се счита, че плодовете на нара и извлеченият от тях сок, допринасят за ползите от Средиземноморската диета – хранителен режим, който е тясно асоцииран с дълголетие и удължен период на оптимално здраве (Moradnia et al., 2024). Въпреки добре проучените благоприятни ефекти за здравето, сокът от нар остава слабо изследван в контекста на неговия потенциал да модулира процесите на стареене.

#### 3.1. Анализ на физиологични параметри и продължителност на живота

Като първа стъпка в оценката на потенциала на сока от нар да модулира процесите на стареене е извършен тест за жизнеспособност, чрез който са определени оптималните концентрации за третиране. Сокът е добавен към инактивирана и десетократно концентрирана култура *E. coli* OP50, така че да бъдат постигнати крайни концентрации в диапазон 10–200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Третирането е проведено за 48 часа, обхващайки ларвните етапи L1–L4. Установено е, че нито една от тестваните концентрации не повлиява значимо жизнеспособността в сравнение с контролната група (Фиг. 24 А). На база на тези резултати за последващите експерименти са селектирани концентрации от 50, 100 и 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Двигателната активност, измерена чрез скоростта и/или броя на огъванията на тялото е индикатор за физиологичното състояние и невромускулната функция при *C. elegans* (Chen X. et al., 2024; Son et al., 2019). Проследяването на движенията отразява координираната активност на дорзалните и вентралните мускули при нематоди и е добре установен възрастово-зависим маркер (Spanoudakis and Tavernarakis, 2023).



**Фигура 14. Сокът от нар (PGJ) подобрява двигателната активност и увеличава продължителността на живот при *C. elegans*.** (А) Тест за жизнеспособност след третиране с PGJ в концентрации от 10 до 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . (В) Продължителност на живот на нематоди, третирани с PGJ в концентрации 50, 100 и 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Сравнението на продължителността на живот, изразена като фракция на преживяемост, между групите третирани с PGJ и контролната група е извършено чрез Kaplan-Meier криви на

преживяемост ( $n = 90$ ). Статистическата значимост между експерименталните групи е определена с log-rank тест. (C) Брой телесни огъвания за 30 секунди на 5<sup>-и</sup> и 10<sup>-и</sup> ден от живота ( $n = 45$ ). (D) Дневен и общ брой потомство на нематоди, третирани с PGJ ( $n = 15$ ). Данните за A, C и D са представени като средна стойност  $\pm$  стандартна грешка на средната (SEM), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  спрямо контролната група (ANOVA).

Третирането със сок от нар в избраните концентрации води до статистически значимо и дозозависимо повишаване на двигателната активност както при млади (ден 5), така и при възрастни нематоди (ден 10; Фиг. 24 C). При младите индивиди наблюдаваният ефект би могъл да бъде свързан с повишена метаболитна ефективност, предвид данни от предходни проучвания, които асоциират приема на сок от нар с митохондриална активация и увеличен енергиен разход (Marhetu et al., 2022). От друга страна, при възрастните червеи запазването на двигателната функция може да отразява потенциален невропротективен ефект (Fahmy et al., 2020).

По отношение на потенциала на сока да модулира дълголетие е наблюдавано статистически значимо повишаване на продължителността на живот единствено при най-високата тествата концентрация от 200  $\mu\text{g/mL}$  (Фиг. 24 B).

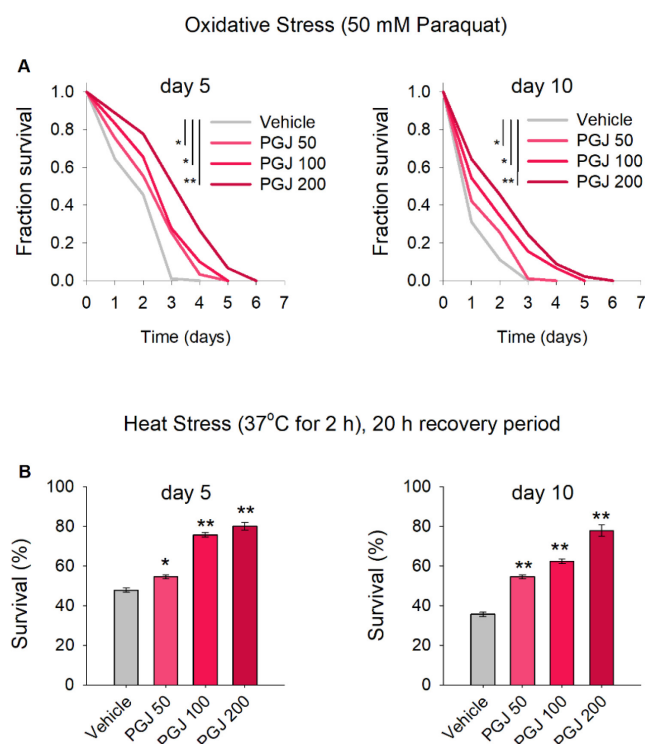
Изследван е и репродуктивният капацитет, включително общият брой потомство за целия репродуктивен период, както и разпределението му по дни. От получените резултати е наблюдавано, че третирането с PGJ не води до статистически значима промяна в размера на потомството спрямо контролната група (Фиг. 24 D). Този резултат допълнително подкрепя липсата на токсичност при приложените концентрации.

В обобщение, фенотипните анализи показват, че сокът от *P. granatum* притежава потенциал да подпомага физиологични параметри, свързани със здравословното стареене, като повишава двигателната активност и запазва репродуктивната функция, а в концентрация от 200  $\mu\text{g/mL}$  е наблюдавано значително повлияване на дълголетие.

### 3.2. Оценка ефекта на PGJ върху устойчивостта към стрес

Повишената устойчивост към стресови фактори е утвърден маркер за здравословно стареене, тъй като е тясно свързана с активация на клетъчни защитни механизми и поддържане на хомеостазата (Banse et al., 2024; Dues et al., 2016; Hetz et al., 2020).

В допълнение към анализа на двигателната активност и репродуктивния капацитет, е оценено въздействието на PGJ върху устойчивостта към стрес – оксидативен и термичен (Фиг. 25 В).



**Фигура 15. Третирането със сок от нар (PGJ) повишава устойчивостта към оксидативен и топлинен стрес.** Нематоди от див тип N2 са третирани с екстракт от PGJ в концентрации 50, 100 и 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  или с носител 0.2% DMSO (vehicle). (A) Криви на преживяемост при индукция на оксидативен стрес с паракват (50 mM), измерени на интервали от 24 часа при N2 нематоди. Данните са обработени чрез анализ на преживяемост по метода на Kaplan–Meier, а статистическата значимост е изчислена чрез log-rank тест, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . (B) Оценка на преживяемостта след излагане на остър топлинен стрес (37 °C за 2 часа), последван от 20-часов период на възстановяване при стандартни условия на ден 5<sup>-и</sup> и ден 10<sup>-и</sup> от жизнения цикъл на N2. Резултатите са представени като процент преживяемост, изразен като средна стойност  $\pm$  SEM,  $n = 90$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  (ANOVA).

Тестовите са проведени при млади (ден 5) и възрастни (ден 10) индивиди. При излагане на остър топлинен стрес (37 °C за 2 часа), при червеите, третирани със сок от

нар, е наблюдавана значително по-висока преживяемост в сравнение с нетретираната контролна група, както при млади така и при възрастни индивиди (Фиг. 25 В).

Аналогични резултати са наблюдавани при теста за устойчивост към остър оксидативен стрес, индуциран чрез метилвиологен (50 mM). На петия ден от развитието, червеите, третирани с PGJ, демонстрират дозозависимо повишение на средната и максималната преживяемост спрямо контролата (Фиг. 25 А). Въпреки че ефектът при възрастни индивиди (ден 10) е по-слабо изразен, тенденцията за повишена устойчивост се запазва.

Обобщено, резултатите показват, че освен подобряване на двигателната функция и запазване на репродуктивния капацитет, сокът от нар засилва устойчивостта към клетъчен стрес както при млади, така и при възрастни нематоди. Това потвърждава неговия потенциал като природен агент за поддържане на здравословен физиологичен статус в процеса на стареене, дори при липса на пряко удължаване на продължителността на живот.

#### 4. Изследване ефекта на ADAPT-232 върху продължителността на живот и митохондриалната функция

Растителните адаптогени са добре проучени по отношение на способността си да повишават устойчивостта на организма към стрес, включително чрез модулация на симпатиковата нервна система и поддържане на физиологичната хомеостаза (Panossian et al., 2021; Tóth-Mészáros et al., 2023). Въпреки това, тяхната роля като потенциални ефектори върху процесите на стареене и митохондриалната функция остава сравнително слабо изяснена, особено когато се прилагат в комбинирани формули.

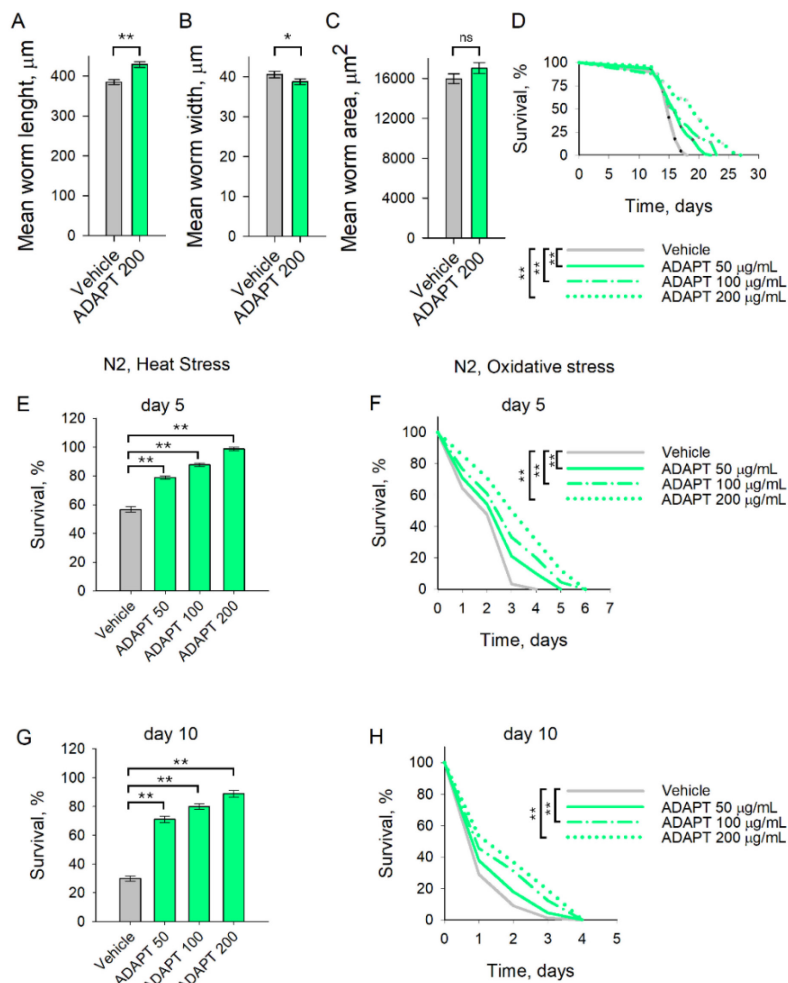
Настоящото изследване има за цел да оцени ефекта на стандартизираната, химически добре охарактеризирана адаптогенна комбинация ADAPT-232, съдържаща екстракти от *Rhodiola rosea* (златен корен), *Schisandra chinensis* (китайски лимонник) и *Eleutherococcus senticosus* (сибирски женшен), върху продължителността на живот, молекулярни маркери на стареене и митохондриалния интегритет при модела *Caenorhabditis elegans*.

##### 4.1. Фенотипни анализи, отговор към стрес и морфологична оценка

Съставът на комбинирания продукт ADAPT-232, включващ екстракти от златен корен, китайски лимонник и сибирски женшен, представлява смес от адаптогени с доказан

благоприятен ефект върху здравето в контекста на физическа издържливост и подобряване на когнитивната функция (Tóth-Mészáros et al., 2023). Въз основа на наличната литература и предварителни данни, за целите на настоящото изследване са избрани три експериментални концентрации: 50, 100 и 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

От анализа за продължителност на живот е установено, че ADAPT-232 дозозависимо модулира процесите на стареене и насърчава дълголетието (Фиг. 26 D), като най-изразен ефект е отчетен при концентрация от 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



**Фигура 16. Прилагането на ADAPT-232 удължава продължителността на живота, повишава устойчивостта към термичен и оксидативен стрес и модулира телесната морфология при *C. elegans*.** Нематоди от див тип са предварително третирани с ADAPT-232 в концентрации 50, 100 или 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  по време на ларвните стадии L3–L4. Морфологията на тялото е анализирана чрез автоматична система за проследяване WormLab, чрез параметрите средна (A) дължина, (B) ширина и (C) площ на тялото, Резултатите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM ( $n = 100\text{--}150$ ); ns – без

статистическа значимост, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (Mann–Whitney rank–sum тест). Преживяемост след излагане на термичен стрес (37 °C) на (E) ден 5<sup>-и</sup> и (G) ден 10<sup>-и</sup> от жизнения цикъл. Преживяемост след прилагане на остър оксидативен стрес (50 mM метилвиологен) на ден (F) 5<sup>-и</sup> и (H) ден 10<sup>-и</sup>. (E, G) Резултатите от топлинния стрес са представени като процент преживяемост (средна стойност  $\pm$  SEM,  $n = 90$ ); ANOVA, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  спрямо групата с носител. (F, H) Процент на преживяемост при оксидативен стрес е проследявана на 24-часови интервали до настъпване на пълна леталност. Данните са обработени чрез анализ на преживяемост по метода на Kaplan–Meier, а статистическата значимост е изчислена чрез log-rank тест, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ,  $n = 90$ .

Установени са и статистически значими промени в морфологията на тялото на *C. elegans* след третиране с ADAPT-232 (Фиг. 26 А, В, С), изразени в удължаване на тялото (Фиг. 26 А) и намаляване на широчината (Фиг. 26 В), което води до цялостно повишаване на телесната площ (body area) спрямо контролната група (Фиг. 26 С).

Тези данни са в съответствие с наличната литература, според която екстракти от растенията, включени в състава на ADAPT-232, като *R. rosea*, увеличават продължителността на живота при преклинични модели като *C. elegans* (Jiang et al., 2021; Teng et al., 2022).

Въз основа на данните за продължителността на живот и установения потенциал на ADAPT-232, е оценен ефектът на комбинацията върху преживяемостта при експозиция на остър клетъчен стрес причинен от излагане на високи температури, както при млади, така и при възрастни индивиди.

Получените резултати показват, че адаптогенната комбинация значимо подобрява термотолерантността при всички тествани концентрации (Фиг. 26 Е, Г). Подобна тенденция е установена и при експозиция на 50 mM паракват (Фиг. 26 F, H), като третираните с ADAPT-232 нематоди проявяват минимална чувствителност към оксидативно увреждане .

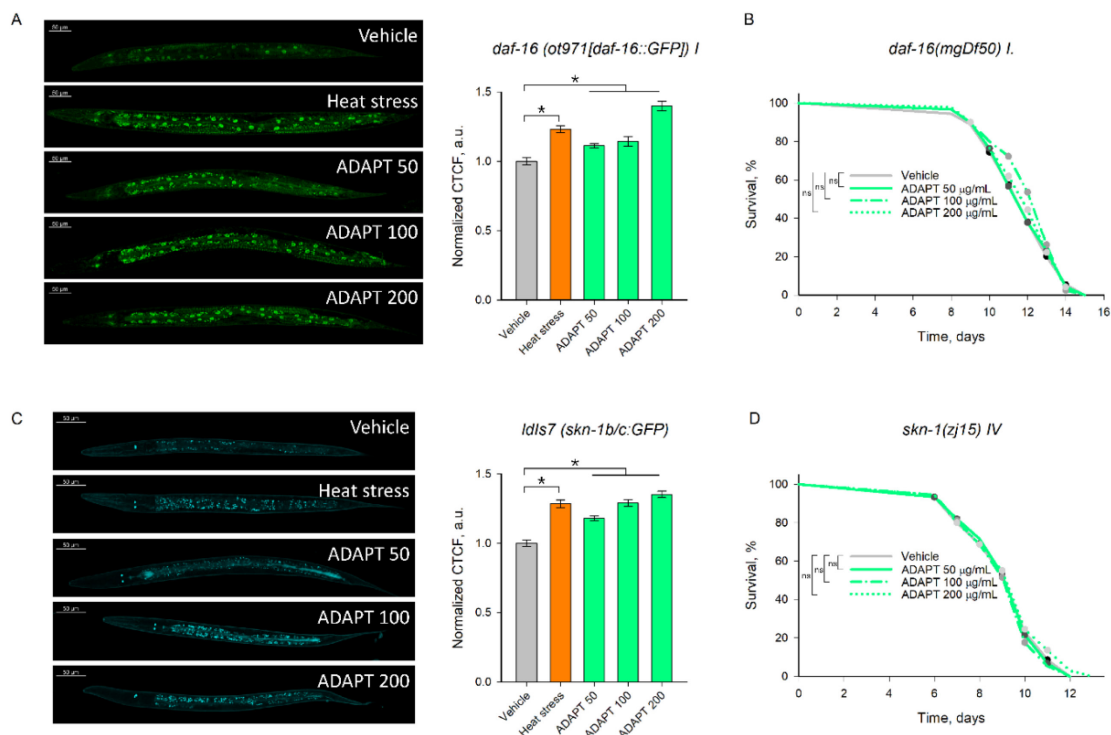
#### 4.2. Изследване на ключови за дълголетието транскрипционни фактори

Транскрипционните фактори DAF-16 и SKN-1 играят централна роля в регулацията на гени, участващи в клетъчния отговор към стрес, метаболитната хомеостаза и процесите на стареене и дълголетие при *C. elegans*. Ядрената транслокация на тези фактори е добре

установен маркер за функционалната им активация и индикация за включване на ендогенни защитни механизми (Jiang et al., 2021; Lin et al., 2018; Sen et al., 2020).

С цел да се установи дали ADAPT-232 индуцира активирание на DAF-16 и SKN-1, е проведен анализ чрез конфокална микроскопия върху GFP-белязани трансгенни линии нематоди: OH16024 *daf-16* [*ot971(daf-16::GFP)*] и LD1 [*skn-1b/c::GFP*].

От получените резултати е установено индуциране на ядрена локализация на DAF-16 при концентрации от 100 и 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Фиг. 27А). Аналогично, при *skn-1* е наблюдавано ясно изразено увеличение на интензитета на GFP сигнала спрямо контролната група, което потвърждава активацията на този регулаторен път (Фиг. 27С). За допълнително потвърждение на наблюдавания ефект е оценен отговорът на мутантни щамове, лишени от функционални DAF-16 и SKN-1. За разлика от дивия тип, при тези мутанти не се установи удължаване на продължителността на живота след третиране с ADAPT-232 (Фиг. 27В,Д), което подкрепя предположението, че благоприятните ефекти на формулата ADAPT-232 са медиирани посредством активирание на DAF-16 и SKN-1.



**Фигура 17. Комбинираният продукт ADAPT-232 индуцира ядрената транслокация на DAF-16 и медира активацията на SKN-1/NRF2. Представителни флуоресцентни конфокални микроскопски изображения при увеличение 20x (мащаб 50  $\mu\text{m}$ ) и коригирана обща клетъчна флуоресценция (CTCF), нормализирана към групата с носител,  $\pm$  SEM,  $n = 60$ , \*\*  $p < 0.05$  (ANOVA) на GFP-белязани *C. elegans* щамове (A)**

OH16024 *daf-16* [ot971(*daf-16::GFP*) I] и LD1 *ldls7* [*skn-1b/c::GFP* + *rol-6(su1006)*], третирани с носител (0.2% DMSO), подложени на топлинен стрес (37 °C за 5 мин) или суплементирани с ADAPT (50, 100 и 200 µg/mL). Криви на преживяемост на мутантни щамове със загуба на функция за (B) DAF-16 (GR1307 *daf-16(mgDf50)* I) и (D) SKN-1 (QV225 *skn-1(zj15)* IV), представени като криви на преживяемост по Kaplan–Meier и анализирани чрез log-rank тест, ns – без статистическа значимост.

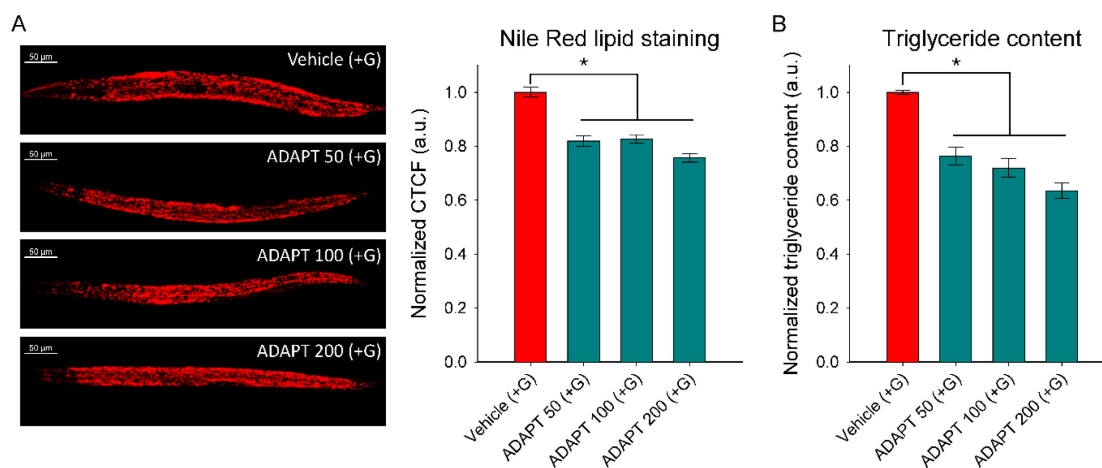
Установената корелация между активацията на двата транскрипционни фактора и демонстрираното повишаване на устойчивостта към стрес и физиологичната функционалност подсказва, че ADAPT-232 действа чрез координирана стимулация на вътрешните защитни механизми. Това отговаря на концепцията за мултимодално адаптогенно действие и подчертава потенциала на комбинирания продукт да модулира процесите на стареене.

#### 4.3. Оценка на ефекта на ADAPT-232 върху нарушен липиден метаболизъм

Процесът на стареене е съпроводен от значителни метаболитни промени, включително влошена глюкозна хомеостаза, повишена инсулинова резистентност и дисрегулация на липидния метаболизъм (Lara-Castor et al., 2025). В тази връзка, в настоящото изследване е използван модел на индуцирана метаболитна дисфункция при *C. elegans*, чрез добавяне на 2% глюкоза към хранителната среда. Експозицията на нематодите на висока концентрация глюкоза води до значително натрупване на липиди, визуализирано чрез флуоресцентна микроскопия след оцветяване с Nile Red, широко използван метод за оценка на неутралните липидни депа (Zong et al., 2024).

Третиране с ADAPT-232 (50, 100 и 200 µg/mL) води до статистически значимо редуциране на триглицеридите в сравнение с глюкозно-контролната група (Фиг. 28 А). Този ефект предполага намалено липидно натрупване, което може да се интерпретира като подобрене в метаболитната регулация. За да се потвърдят тези наблюдения, е извършен и колориметричен количествен анализ на триглицеридите, от който е установено, че всички тествани концентрации на ADAPT-232 значително намаляват нивата на триглицериди (Фиг. 28 В).

Модулацията на липидния метаболизъм вероятно представлява част от интегралния клетъчен отговор, индуциран от формулата и насочен към поддържане на метаболитната хомеостаза в условия на стрес.

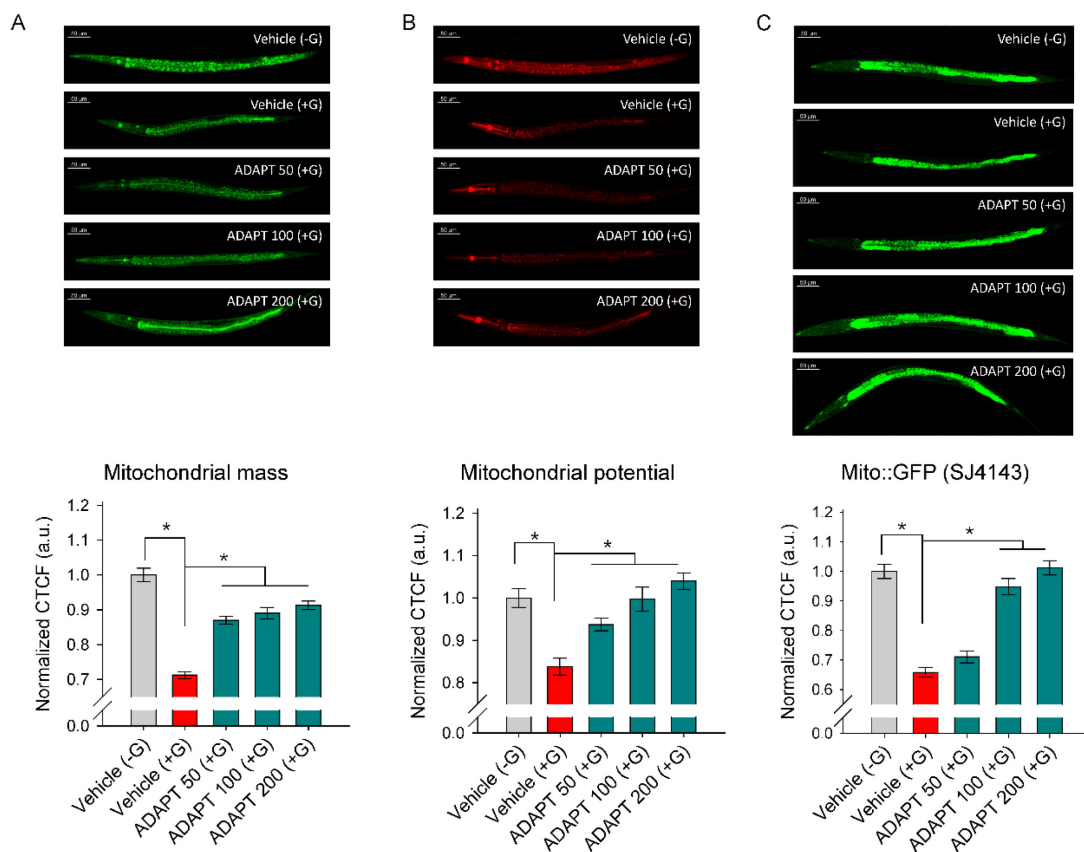


**Фигура 18. Комбинираният продукт ADAPT-232 намалява натрупването на липиди при *C. elegans*.** (A) Представителни конфокални изображения на Nile Red оцветяване на липиди при модел на глюкозо-индуцирано натрупване на липиди при *C. elegans*, третирани за 24 h с 50, 100, 200 µg/mL ADAPT-232 или с носител (0.2% DMSO). (B) Количествено определяне на натрупването на липиди, представено като коригирана обща клетъчна флуоресценция (CTCF) и (C) нормализирано съдържание на триглицериди, изразено в условни единици (a.u.). Стойности са представени като средни  $\pm$  SEM; \*  $p < 0.05$  спрямо групата с носител (+G), ANOVA.

#### 4.4. Изследване ефекта на ADAPT-232 върху митохондриална дисфункция

Освен че причинява натрупване на липиди, добавянето на глюкоза в хранителната среда на *C. elegans* е утвърден подход за моделиране на митохондриална дисфункция. Високите концентрации на глюкоза водят до намалена митохондриална ефективност, понижен мембранен потенциал и нарушена енергийна хомеостаза – промени, които са характерни за метаболитен синдром, диабет тип 2 и възрастово-свързани дегенеративни състояния (Mao et al., 2019; Zong et al., 2024).

С цел да се оцени потенциалния ефект на ADAPT-232 върху митохондриалната функция, е извършен флуоресцентен анализ с помощта на специфични багрила – MVBG, маркиращо митохондриалната маса, и TMRE чувствително към митохондриалния мембранен потенциал (Фиг. 29 А, В). При *C. elegans* митохондриалната дисфункция активира каскада от защитни механизми, като най-изразени промени се наблюдават в чревните митохондрии, които биват преразпределени към лумена на чревните клетки (Mao et al., 2019; Onraet et al., 2023).



**Фигура 19. Прилагането на ADAPT-232 възстановява митохондриалната маса и потенциал при модел на митохондриална дисфункция и подобрява преноса на енергия в червата при щам SJ4143.** Представителни конфокални изображения и съответстваща обща клетъчна флуоресценция (CTCF), нормализирана спрямо контролата (-G), на: (A) нематоди N2, оцветени с MVG, (B) нематоди N2, оцветени с TMRE, и (C) нематоди щам SJ4143, третирани за 24 h с 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ADAPT-232 или с носител (Vehicle), при наличие (+G) или отсъствие (-G) на глюкоза. Средни стойности  $\pm$  SEM,  $n = 60$ ; \* $p < 0.05$  ANOVA.

В допълнение на анализа за митохондриална маса и потенциал, е проследен митохондриалният отговор при трансгенен щам нематоди (SJ4143) със GFP-белязани митохондрии, локализирани в чревните клетки (Фиг. 29 C). Използването на този щам предоставя ценна информация относно както масата на чревните митохондрии, така и тяхната активност, като по този начин дава цялостна представа за енергийния обмен в чревната тъкан.

Резултатите показват, че глюкозната диета води до статистически значимо намаление на

флуоресцентния интензитет в сравнение с контролната група, което потвърждава наличие на митохондриална дисфункция (Фиг. 29 А, В, С). Добавянето на ADAPT-232 към глюкозните условия възстановява нивата на флуоресценция до стойности, съпоставими с тези при нормални условия (Фиг. 29 А, В, С), като ефектът е статистически значим спрямо глюкозно-третираната група. Тези данни подкрепят хипотезата, че ADAPT-232 упражнява протективен ефект върху чревната митохондриална функция, като противодейства на индуцираното от глюкозата увреждане.

## VI. ДИСКУСИЯ

В съвременната биомедицинска наука процесът на стареене се разглежда като основен рисков фактор за развитието на хронични незаразни заболявания и е водещ механизъм за прогресивно влошаване на качеството на живот (López-Otín et al., 2013, 2023; Shen et al., 2024). В контекста на глобалната тенденция към застаряване на населението, нараства необходимостта от разработване на ефективни стратегии за превенция и модулиране на стареенето на клетъчно и молекулярно ниво (Chen et al., 2018, 2025; Liu et al., 2025).

Един от перспективните подходи за забавяне процесите на стареене е използването на природни продукти от растителен произход като източник на структурно разнообразни вторични метаболити (Longo and Anderson, 2022; Thomas et al., 2023). Въпреки че редица природни продукти са изследвани в контекста на различни патологични състояния, тяхното системно проучване като потенциални геропротектори остава динамично развиваща се научна област (Fahey et al., 2021; Guo et al., 2022).

Настоящият дисертационен труд прилага интегративен подход, който съчетава етнофармакологичен подбор на природни продукти от растителен произход с функционални и молекулярни анализи, насочени към изследване потенциала им за повлияване на еволюционно консервативни механизми на стареене.

Изследваните интервенции обхващат различни нива на фитохимична сложност – от биологично активни вещества (икариин), през растителни екстракти (листна маса на *P. granatum*), до функционални храни (сок от плодовете на *P. granatum*) и стандартизирана комбинирана формула (ADAPT-232). Този подход позволява оценка на ефектите както на индивидуални вещества, така и на комплексни фитохимични смеси върху ключови процеси, свързани с физиологичното стареене и дълголетие.

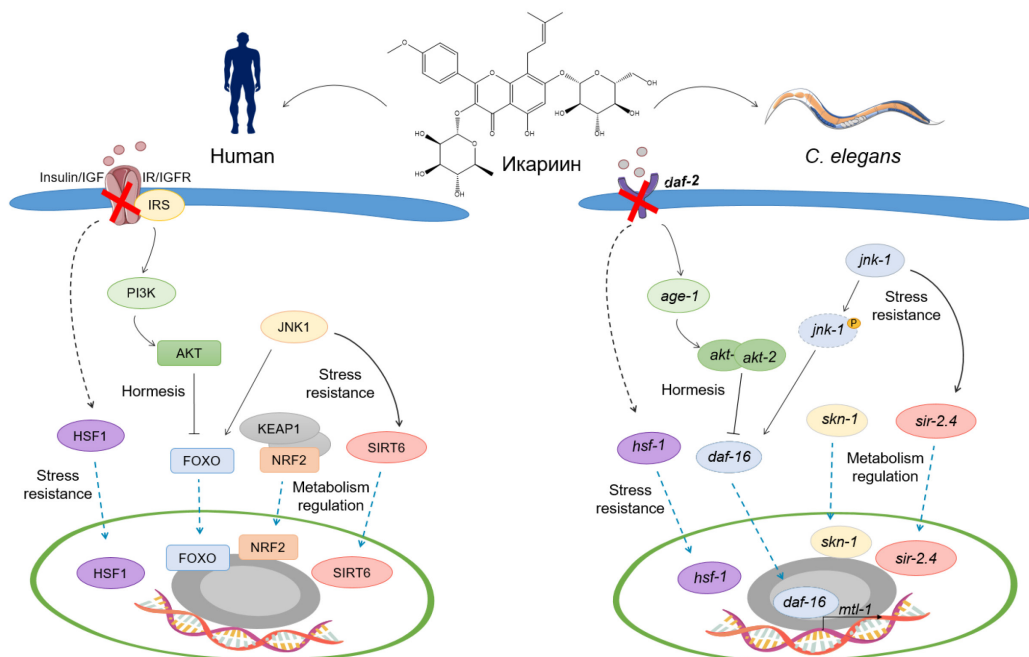
1. Икариин подобрява устойчивостта на стрес и удължава продължителността на живота при *C. elegans* чрез hsf-1 и daf-2-медиран хорметичен отговор

Резултатите от настоящето изследване показват че икариин индуцира удължаване на живота при дивия тип *C. elegans* (N2), като този ефект не се наблюдава при daf-2 мутанти, което насочва към ключовата роля на IIS пътя в механизма на действие. Освен удължената продължителност на живота, третираните с икариин нематоди проявяват подобрена подвижност, повишена устойчивост към топлинен и оксидативен стрес, както и значително намалено натрупване на липиди.

Наблюдаваната комбинация от засилена устойчивост към оксидативен и топлинен стрес, съчетана с подобрена двигателна активност, насочва към хорметичен механизъм на действие. Този принцип лежи в основата на редица интервенции за удължаване на живота, включително калорийно ограничение, периодично гладуване и контролирано излагане на леки стресови стимули (Matai et al., 2019; Shaposhnikov et al., 2022).

По-конкретно, HSF-1, който е главен регулатор на отговора към термичен шок и поддържането на протеостазата, се активира от икариин при по-високи дози, което е в съответствие с ролята му като критичен модулатор на процеса хормеза (Tan et al., 2022; Xu et al., 2023). Подобен отговор демонстрират и други биологично активни вещества с хорметичен профил, като ресвератрол, кверцетин и сулфорафан (Martel et al., 2019).

Третирането с икариин има изявен дозозависим хорметичен ефект, при който концентрацията от 50  $\mu\text{M}$  се явява като оптимална за индуциране на координирана регулация на DAF-16 и SKN-1. В тази доза се наблюдава ядрена транслокация на DAF-16, както и повишена експресия на *sir-2.4* и *jnk-1*, които са ключови регулатори на стресовата сигнализация и процеса на автофагия (Hansen et al., 2018; Lin et al., 2018; Tuohetaerbaike et al., 2020). При по-високата използвана доза (100  $\mu\text{M}$ ) се наблюдава пренасочване на механизма основно към HSF-1, докато активността на останалите пътища е значително редуцирана, което е класически пример за дозозависима бимодалност, типична за хормеза (Jodynys-Liebert et al., 2020; Xu et al., 2022). Въз основа на получените резултати, схематично е обобщен модел, илюстриращ молекулярен механизъм на действие на икариин, свързан с хорметичен отговор и удължаване на живота (Фиг. 20).



**Фигура 20.** Предложен механизъм на действие, илюстриращ еволюционно-запазени молекулярни участници, отговорни за хорметичния ефект на икариин при *C. elegans*. При концентрация от 50  $\mu\text{M}$  икариин индуцира потискане на *daf-2*/IGF, ключов компонент на инсулин/IGF сигналния път (IIS). Това води до активиране на транскрипционния фактор DAF-16/FOXO, който се транслокира в ядрото и индуцира експресията на металотионеин *mtl-1*, участващ в клетъчната защита от оксидативен стрес. При условия на стрес, активирането на *jnk-1*/JNK1 подпомага ядрената транслокация на DAF-16, както и участва в активирането на *sir-2.4*/SIRT6. При третиране с 50  $\mu\text{M}$  икариин се повишава експресията и на *skn-1*/NRF2, което вероятно допринася за подобряване на клетъчната хомеостаза. От особено значение е активирането на *hsf-1*/HSF1 при всички тествани концентрации на икариин, което го поставя в центъра на наблюдаваните ефекти върху продължителността на живот. Като основен регулатор на протеостазата, *hsf-1* вероятно играе решаваща роля за медирания от икариин положителен ефект върху дълголетието.

2. Екстракт от листа на *P. granatum* насърчава дълголетието чрез взаимодействието на сигналните пътища HLH-30/TFEB, DAF-16/FOXO и SKN-1/NRF2

В настоящето изследване, третирането с екстракт от листна маса на *P. granatum* (PGL) значимо подобрява двигателната активност и фертилността при *C. elegans*, като

наблюдаваният ефект може да се асоциира с подобрен митохондриален интегритет. Намалената двигателна активност при стареене често се асоциира с митохондриална дисфункция, поради което възстановяването ѝ чрез PGL предполага благоприятно въздействие върху клетъчната енергийна хомеостаза (Daskalaki et al., 2023; Spanoudakis and Tavernarakis, 2023).

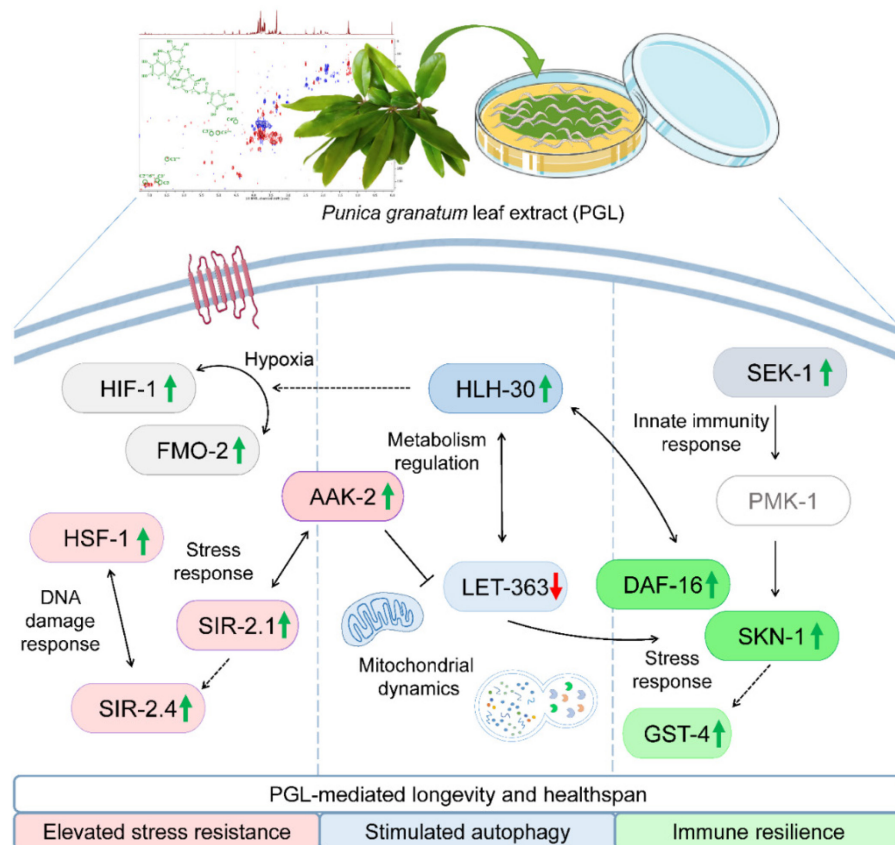
Изследването на метаболитните параметри разкрива, че третирането с PGL води до повлияване на базалния метаболизъм, изразено в намаляване натрупването на липиди при *C. elegans*. Този резултат е съпроводен и от повишена експресия на транскрипционния фактор *hlh-30*/TFEB и понижена експресия на *let-363*/mTOR и двата от които са ключови регулатори на процеса на автофагия. Данните, получени от прилагане на оксидативен стрес на двойномутантния щам MIR-13, със значително намалена функция на гените *aak-2* и *sir-2.1*, потвърждават функционалната значимост на тази ос в осигуряването на защита срещу оксидативен стрес, като PGL не успява да възстанови устойчивостта на стрес при понижената активност на *aak-2* и *sir-2.1*.

Третирането с PGL води до повишена експресия и ядрена транслокация на транскрипционните фактори DAF-16/FOXO и HLH-30/TFEB, което е индикатор за активиране на клетъчни механизми, асоциирани с удължаване на живота и поддържане на протеостазата. Макар да се наблюдава повишена експресия на *daf-2*, което би предполагало активация на IIS пътя и инхибиране на DAF-16, ефектът върху DAF-16 е обратен и вероятно се дължи на алтернативен механизъм, свързан с инхибиране на mTOR сигнализацията. Тази хипотеза се подкрепя допълнително от едновременното повишаване на нивата на *skn-1*/NRF2 и неговия таргетен ген *gst-4*, което потвърждава активиране на антиоксидантните защитни механизми.

Стимулирането на митохондриалната маса и  $\Delta\Psi_m$ , наблюдавано при третиране с PGL, подсказва подобрена митохондриална биогенеза и функция, вероятно в резултат на едновременната регулация на *hlh-30* и *let-363*. Този ефект се асоциира с по-добро клетъчно дишане, подобрена енергийна ефективност и устойчивост към възрастни дегенеративни процеси, включително и в имунния отговор, медиран от *sek-1*/PMK-1/p38 MAPK. Получените резултати очертават молекулярната основа на биологичната активност на екстракта от листна маса на нар и предоставят убедителни доказателства, че третирането с PGL активира еволюционно консервативни клетъчни пътища, ангажирани в отговора към стрес, метаболитната адаптация и регулацията на дълголетието при *C. elegans*.

Най-същественният извод от това изследване е, че HLH-30/TFEB се очертава като централен регулаторен възел в механизма на действие на PGL, като координира метаболитни, антиоксидантни и свързани със отговора към стрес молекулярни пътища. Данните отварят нови възможности за използването на екстракта от листа на нар като потенциална природна интервенция за забавяне на стареенето и подобряване на здравословния живот.

Предложеният модел, базиран на получените резултати за механизма на действие, е представен на Фигура 21.



**Фигура 21. Молекуларен механизъм на ефекта на екстракт от листа на нар (PGL) върху сигналната мрежа, свързана с регулацията на дълголетие при *C. elegans*.** Екстрактът от PGL активира каскада от молекулярни събития, насочени към засилване на клетъчната устойчивост и метаболитната хомеостаза. Установено е, че транскрипционният фактор HLH-30 се активира в отговор на PGL и медира експресията на гени, свързани с отговора към условия на хипоксия, включително *hif-1* и *fmo-2*, като по този начин активира стресовия отговор. Едновременно с това, HLH-30 взаимодейства с LET-363/mTOR, като допринася за подобряване на метаболизма и повишаване на митохондриалния трансмембранен потенциал ( $\Delta\Psi_m$ ). В допълнение, *let-*

363 участва в модуляцията на DAF-16/FOXO и SKN-1/NRF2, докато паралелно с това, *sek-1*, като част от вродената имунна сигнализация, индуцира активиране на *pmk-1*, което от своя страна води до експресия на SKN-1 и *gst-4*. От друга страна, коактивацията на *aak-2*/AMPK и *sir-2.1*/SIRT1 засилва отговора към оксидативен стрес, а HSF-1 и *sir-2.1* синергизират в активирането на механизми за възстановяване на ДНК от увреждания. Всички тези взаимодействия подчертават мултимодалния ефект от третиране с PGL и неговия потенциал да модулира дълголетието чрез консервативни молекулярни пътища.

3. Сок от *P. granatum* подобрява физиологичния спад свързан със стареенето и модулира отговора към стрес

Резултатите от настоящето изследване показват, че сокът от нар води до удължаване на продължителността на живота само при концентрация 200 µg/mL в сравнение с контролната група. Наблюдава се и значително повишаване на двигателната активност както при млади, така и при стареещи индивиди, което е индикатор за подобрена невромускулна функция. Това наблюдение е в съответствие с редица предходни проучвания, демонстриращи невромодулаторния и невропротективен потенциал на сока от нар, както и неговите компоненти, в експериментални модели на болестта на Алцхаймер и болестта на Паркинсон (Chen P. et al., 2025; Eghbali et al., 2021; Maphetu et al., 2022). В допълнение, подобрената двигателна активност може да бъде свързана и с повишена енергийна ефективност и оптимизирана митохондриална функция, което кореспондира с данни, свързващи приема на сок от нар с благоприятни ефекти при метаболитни нарушения като затлъстяване и захарен диабет тип 2, посредством стимулиране на митохондриалната активност и подобряване на енергийния метаболизъм (Bahari et al., 2024; Vanihani et al., 2019). Наблюдаваното в настоящото изследване повишаване на устойчивостта към стрес при третиране със сок от нар вероятно представлява ключов механизъм, чрез който се реализират неговите благоприятни ефекти върху здравословното състояние на организма.

В заключение, резултатите от настоящото изследване показват, че сокът от нар повишава продължителността на живота при *C. elegans*, и води до подобрение на функционални показатели, свързани със здравословното стареене. Установеното повишаване на двигателната активност и устойчивостта към стрес свидетелстват за благоприятен ефект върху физиологичното състояние на организма.

4. Комбинираният продукт ADAPT-232 забавя процесите на стареене и подобрява митохондриалната функция чрез регулиране на DAF-16 и SKN-1

В настоящото проучване е установено, че комбинираният продукт ADAPT-232 води до значително удължаване на продължителността на живота, което на молекулярно ниво корелира с повишена активация на DAF-16 и SKN-1. Това предполага, че тези транскрипционни фактори представляват централни медиатори както на подобряващата здравето активност на формулата, така и на нейния основен механизъм на действие.

Получените резултати показват, че комбинираният продукт ADAPT-232 проявява многопластов ефект върху здравословната продължителност на живота, като подобрява метаболитната и митохондриалната хомеостаза, стимулира липидния катаболизъм и подпомага контрола на митохондриалното качество, в значителна степен чрез координираната активация на DAF-16 и SKN-1. Тези данни предоставят механистична основа за потенциала на ADAPT-232 да противодейства на митохондриалната дисфункция и подчертават обещаващата му роля като подпомагаща интервенция при свързани със стареенето и метаболизма нарушения. Получените в настоящото изследване резултати показват, че ADAPT-232 ефективно понижава съдържанието на триглицериди в модел на глюкозо-индуцирано липидно натрупване при *C. elegans*. Това наблюдение е в съответствие с предходни проучвания, демонстриращи, че екстрактът от *R. rosea* понижава нивата на глюкоза при *C. elegans* чрез активация на АМПК-сигналния път (Teng et al., 2022).

#### 5. Заключение и бъдещи насоки

В настоящото В обобщение, дисертационният труд допринася както с нови механистични данни за действието на природни продукти върху процесите на стареене, така и с разработването на интегративна експериментална платформа с широк изследователски потенциал. Получените резултати подкрепят концепцията, че таргетирането на фундаменталните биологични механизми на стареене чрез природни съединения представлява реалистична и научно обоснована стратегия за удължаване на здравословния живот и създават основа за бъдещи молекулярни и клинични изследвания в областта на геронтологията и фитотерапията.

## VII. ИЗВОДИ

1. Успешно е интегрирана моделната система *C. elegans* като платформа за изследване на потенциала на природни продукти от растителен произход върху процесите на стареене и регулацията на дълголетието на организмово ниво.
2. Получени са доказателства за хорметичните свойства на пренилирания флавоноид икариин, чрез които сеудължава продължителността на живота и се медира стресовия отговор.
3. Икариинът проявява геропротективен ефект чрез модулиране на сигналните пътища *daf-2* и *hsf-1*, като по този начин забавя възрастово-асоциирания физиологичен спад.
4. Екстрактът от листа на нар подобрява митохондриалната функция, забавя процесите на стареене и удължава продължителността на живота посредством координираното взаимодействие на транскрипционните фактори HLH-30, SKN-1, и DAF-16.
5. Сокът от нар демонстрира потенциал за забавяне на възрастово-асоциирания физиологичен спад и подобрява функционални показатели на здравословното остаряване.
6. Комбинираният продукт на основата на растителни адаптогени ADAPT-232 подобрява оптималния период на здраве чрез повлияване на митохондриалната функция и липидната хомеостаза.

## VIII. ПРИНОСИ

Приноси с научно-фундаментален характер:

1. Демонстрирана е ефективността на моделната система *C. elegans* като интегративна платформа за изследване на природни продукти с потенциал за модулиране на стареенето и дълголетието на организмово ниво.
2. Установена е хорметичната природа и механизмът на действие на икариин, включващ модулиране на инсулин/инсулиноподобната сигнализация и *hsf-1*.
3. За първи път е идентифицирана ролята на транскрипционния фактор HLH-30 като ключов медиатор на геропротективния ефект на екстракта от листа на нар, в координация с SKN-1 и DAF-16.
4. Охарактеризиран е ефектът на сок от нар върху свързаните със стареенето физиологични прояви при *C. elegans*.
5. Установен е потенциалът на ADAPT-232 да повлиява процесите на стареене чрез модулиране на митохондриалната функция и метаболитната хомеостаза.

Приноси с научно-приложен характер:

1. Интегрирана е експериментална платформа за функционална оценка на потенциала на природни продукти върху процесите на стареене и дълголетие при нематоди от вида *C. elegans*.
2. Получените данни за геропротективния ефект на ADAPT-232 могат да послужат като основа за неговото пренасочване от продукт за контрол на стреса и физическото натоварване към интервенция с възможно приложение за подържане на метаболитния баланс и митохондриално здраве.
3. Адаптиран и валидиран е модел на митохондриална дисфункция чрез индуциране на митохондриален стрес посредством високовъглероден прием при *C. elegans*, приложим за оценка на ефективността на метаболитно-насочени интервенции.

## **Благодарности**

С дълбока признателност изразявам благодарността си към научния си ръководител проф. д-р Милен И. Георгиев за доверието, търпението, вдъхновяващите идеи и ценните напътствия през целия период на моята докторантура.

Сърдечно благодаря на колегите си от лаборатория по Метаболомика към Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, гр. Пловдив и от Център по растителна системна биология и биотехнология, гр. Пловдив, за подкрепата, споделените идеи и удоволствието да творим наука заедно.

Изразявам признателност към ръководството на Института по микробиология „Стефан Ангелов“ за създадената благоприятна среда за научна работа и възможностите за професионално развитие.

Научните изследвания, включени в настоящия дисертационен труд, са осъществени с финансовата подкрепа на проект PlantaSYST (SGA No. 739582 и FPA No. 664620) по програма „Хоризонт 2020“ на Европейския съюз, както и на проект BG05M2OP001-1.003-001-C01, финансиран от Европейския фонд за регионално развитие чрез Оперативна програма „Наука и образование за интелигентен растеж“. Изследванията са подкрепени и от Фонд „Научни изследвания“ към Министерството на образованието и науката на Република България (договори № КП-06-КОСТ/11 и № КП-06-КОСТ/12).

## Публикувани материали по дисертацията

### Научни публикации

1. **Todorova M.N.**, Savova M.S., Mihaylova L.V., Georgiev M.I. (2024) Nurturing longevity through natural compounds: Where do we stand and where do we go? *Food Frontiers*, 5: 267-310 (IF<sub>2024</sub> **6.9**; Q1).
2. **Todorova M.N.**, Savova M.S., Mihaylova L.V., Georgiev M.I. (2024) Icarin improves stress resistance and extends lifespan in *Caenorhabditis elegans* through *hsf-1* and *daf-2*-driven hormesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(1): 352 (IF<sub>2024</sub> **4.9**; Q1).
3. **Todorova M. N.**, Savova, M. S., Mihaylova, L. V., Georgiev M.I. (2024) *Punica granatum* L. leaf extract enhances stress tolerance and promotes healthy longevity through HLH-30/TFEB, DAF16/FOXO, and SKN1/NRF2 crosstalk in *Caenorhabditis elegans*. *Phytomedicine*, 134: 155971 (IF<sub>2024</sub> **8.3**; Q1).

### Участия на научни форуми

#### Устни доклади

1. **Todorova M.N.**, Georgiev M.I. (2023) Targeting pro-longevity pathways in *Caenorhabditis elegans* through natural compounds – icarin effect on stress resistance and lifespan. *CIVIS BIP Program “From medicinal plants to drug products”*, 18 September – 06 October, Athens, Greece.
2. Georgiev M.I., **Todorova M.N.** (2024) Nurturing longevity through natural compounds. *12<sup>th</sup> Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries*, 17–19 October, Izmir, Turkiye.
3. Georgiev M.I., Mihaylova L.V., Savova M.S., **Todorova M.N.** (2024) Utilizing natural products for weight management and longevity promotion. *International Congress on Natural Products Research*, 13–17 July, Krakow, Poland.

#### Постерни презентации

1. **Todorova M.N.**, Savova M.S., Mihaylova L.V., Georgiev M.I. (2023) Effect of icarin on longevity stress resistance and fitness of *Caenorhabditis elegans*. *5<sup>th</sup> International Conference of Natural Products Utilization: from Plants to Pharmacy Shelf*, 30 May – 2 June, Sts. Constantine and Helena resort, Bulgaria.
2. **Todorova M.N.**, Savova M.S., Mihaylova L.V., Georgiev M.I. (2023) Plant-derived

natural compounds for healthspan improvement and longevity. *2<sup>nd</sup> International Conference on Plant Systems Biology and Biotechnology*, 25–26 September, Center of Plant Systems Biology and Biotechnology, Plovdiv, Bulgaria.

3. **Todorova M.N.**, Binev B.K., Georgiev M.I. (2024) Exploring the potential of ADAPT-232: plant adaptogens for healthy aging, and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *International Congress on Natural Products Research*, 13–17 July, Krakow, Poland.
4. **Todorova M.N.**, Savova M.S., Mihaylova L.V., Binev B.K., Georgiev M.I. (2024) Exploring the therapeutic potential of *Punica granatum* leaves extract in enhancing healthspan and lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *International Congress on Natural Products Research*, 13–17 July, Krakow, Poland.

Цитирания на публикациите, свързани с дисертационния труд с изключени самоцитирания – 17 (Скопус, 02.04.2026 г.); H индекс – 4.

Общ импакт фактор на публикациите, свързани с дисертационния труд – 20.1.