

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ



**ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ
НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА**



ЛАБОРАТОРИЯ “ГЕНОМНА ДИНАМИКА И СТАБИЛНОСТ”

ЗЛАТИНА ИВАНОВА ГОСПОДИНОВА

**АНТИТУМОРНО ДЕЙСТВИЕ НА БЪЛГАРСКИТЕ ЛЕЧЕБНИ
РАСТЕНИЯ *COTINUS COGGYGRIA* SCOP., *TANACETUM VULGARE* L.
И *CICHORIUM INTYBUS* L. ВЪРХУ ЧОВЕШКИ РАКОВИ КЛЕТЪЧНИ
ЛИНИИ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация за присъждане на образователната и научна степен “доктор”

Професионално направление: 4.3. „Биологични науки“

Научна специалност: „Генетика“

Научен консултант:

гл. ас. д-р Мария Кръстева

Рецензенти:

Проф. д-р Любомир Стоилов

Доц. д-р Милена Мурджева

София, 2017



Дисертационният труд е с обем от 163 страници и съдържа 40 фигури и 10 таблици. Списъкът на цитираната литература обхваща 293 литературни източника, 14 от които на кирилица.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на разширен Научен съвет на Лаборатория „Геномна динамика и стабилност“ към Институт по физиология на растенията и генетика - БАН, проведено на 19.09.2017 г.

Експерименталната работа по дисертацията е проведена основно в лаборатория „Геномна динамика и стабилност“, Институт по физиология на растенията и генетика – БАН. Част от изследванията са проведени в Катедра „Фармакодинамика и биофармация“, Фармацевтичен факултет, Сегедски университет, Унгария и Институт по биофизика и биомедицинско инженерство - БАН.

Изследванията по дисертационния труд са финансирани главно от проект BG051PO001-3.3.06-0025 по Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси”, съфинансирана от Европейския социален фонд на Европейския съюз, и проект ДФНП-208/16.05.2016 по Програма за подпомагане на младите учени в БАН.

Публичната защита ще се състои на 2017 г., от часа в залата на ИФРГ-БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 21, ет. 2, гр. София.

Научното жури е в състав:

Вътрешни членове:

проф. д-р Валя Василева - ИФРГ, БАН – председател

проф. д-р Любомир Стоилов - ИФРГ, БАН

Външни членове:

доц. д-р Милена Мурджева - ИБИР, БАН

доц. д-р Маргарита Пешева - БФ, СУ

доц. д-р Светослав Димов - БФ, СУ

Материалите по защитата са на разположение на интересувалите се в библиотеката на Институт по физиология на растенията и генетика – БАН, ул. „Акад. Георги Бончев”, бл. 21, ет. 2, ст. 225 и на web-страницата на ИФРГ – БАН, <http://www.bio21.bas.bg/ippg/bg/>.

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ



**ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ
НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА**



ЛАБОРАТОРИЯ “ГЕНОМНА ДИНАМИКА И СТАБИЛНОСТ”

ЗЛАТИНА ИВАНОВА ГОСПОДИНОВА

**АНТИТУМОРНО ДЕЙСТВИЕ НА БЪЛГАРСКИТЕ
ЛЕЧЕБНИ РАСТЕНИЯ *COTINUS COGGYGRIA* SCOP.,
TANACETUM VULGARE L. И *CICHORIUM INTYBUS* L.
ВЪРХУ ЧОВЕШКИ РАКОВИ КЛЕТЪЧНИ ЛИНИИ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация за присъждане на образователната и научна степен “доктор”

Професионално направление: 4.3. „Биологични науки“

Научна специалност: „Генетика“

Научен консултант: гл. ас. д-р Мария Кръстева

София, 2017

*Бих искала да изкажа своята голяма благодарност към научния си консултант гл. ас. д-р **Мария Кръстева** за това, че беше мой учител през годините, от самото начало на моя път като учен, за помощта и силната подкрепа, която ми оказа за реализирането на настоящия дисертационен труд.*

*Дължа специална благодарност на д-р **Istvan Zupkó**, Фармацевтичен факултет, Сегедски университет, Унгария, за предоставената възможност за провеждане на специализация в неговата лаборатория, обучението и съдействието при осъществяване на флоуцитометричните анализи и анализи на клетъчната пролиферация, както и на неговия екип за съдействието.*

*Признателна съм на гл. ас. д-р **Василиса Манова** за оказаната помощ, ангажираността и безценните съвети при провеждането на транскрипционния анализ.*

*Бих искала да спомена с благодарност за приноса им в отделни етапи от разработването на дисертационния труд гл. ас. д-р **Марияна Георгиева**, проф. дбн **Стефка Танева**, гл. ас. д-р **Светла Тодинова** и доц. д-р **Милена Николова**.*

*Изказвам своята признателност към **ръководството на ИФРГ-БАН** за цялостното съдействие.*

*Благодаря от сърце на **всички колеги**, които бяха и в момента са част от **Лаборатория „Геномна динамика и стабилност“**, за това, че споделиха ценния си професионален опит с мен, за положителното им отношение и отзивчивостта им.*

*Безкрайно благодаря на **моего семейство** за безусловната обич и подкрепа, която винаги са ми давали, и на **съпруга ми** за опората, която е за мен.*

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	4
1. УВОД	5
2. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ	7
3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	10
3.1. Материали	10
3.1.1. Растителни екстракти	10
3.1.2. Клетъчни линии	10
3.1.2.1. Туморни клетъчни линии	10
3.1.2.2. Нетуморогенна клетъчна линия	11
3.2. Методи	12
3.2.1. Получаване на фракции от тотален растителен екстракт	12
3.2.2. Клетъчно култивиране	12
3.2.3. Тест с трипаново синьо	12
3.2.4. МТТ анализ	12
3.2.5. Наблюдение на клетъчната морфология	13
3.2.6. Анализ на способността на туморните клетки да формират колонии (клоногенност)	13
3.2.7. Алкален кометен анализ	13
3.2.8. Флоуцитометричен анализ	14
3.2.9. Флуоресцентен микроскопски анализ	15
3.2.10. Диференциална сканираща калориметрия	15
3.2.11. Количествена полимеразна верижна реакция след обратна транскрипция (qRT-PCR)	15
4. РЕЗУЛТАТИ	18
4.1. Оценка на <i>in vitro</i> антитуморния потенциал на тотални екстракти и фракции от българските лечебни растения <i>Cotinus coggygria</i>, <i>Tanacetum vulgare</i> и <i>Cichorium intybus</i>	18
4.1.1. Анализ на цитотоксичните и антипролиферативни свойства	18
4.1.1.1. <i>Cotinus coggygria</i>	18
4.1.1.2. <i>Tanacetum vulgare</i>	25
4.1.1.3. <i>Cichorium intybus</i>	31
4.1.2. Подбор на екстракти/фракции с най-висок антитуморен потенциал	34
4.2. Изследване на молекулярни механизми на антитуморното действие на български лечебни растения	35
4.2.1. Механизми на антитуморно действие на тотален екстракт от <i>Cotinus coggygria</i>	35
4.2.1.1. Повлияване на баланса клетъчна пролиферация/клетъчна смърт	35

4.2.1.2. Генотоксичен ефект	38
4.2.1.3. Влияние върху способността на клетките да формират колонии	40
4.2.1.4. Ефект върху термодинамичното поведение на клетките	40
4.2.1.5. Модулиране на процеса на метилиране на ДНК	41
4.2.2. Механизми на антитуморно действие на хлороформна фракция на екстракт от <i>Tanacetum vulgare</i>	44
5. ОБСЪЖДАНЕ	46
5.1. Оценка на антитуморния потенциал на <i>Cotinus coggygia</i>	47
5.2. Оценка на антитуморния потенциал на <i>Tanacetum vulgare</i>	54
5.3. Оценка на антитуморния потенциал на <i>Cichorium intybus</i>	58
6. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ	61
7. ЛИТЕРАТУРА	63
ПУБЛИКАЦИИ, НАУЧНИ ПРОЯВИ, ЦИТАТИ, УЧАСТИЯ В ПРОЕКТИ И СПЕЦИАЛИЗАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	66

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АО	Акридин Оранжев
ДСК	Диференциална Сканираща Калориметрия
ЕР	Естроген Рецептор
кДНК	комплементарна ДНК
мРНК	матрична РНК
ПР	Прогестерон Рецептор
РМЖ	Рак на Млечната Жлеза
Ald	ald olase (алдолаза)
DMEM	D ulbecco's M odified E agle M edium
DNMT	DNA methyltransferase (ДНК метилтрансфераза)
EGCG	E pigallocatechin-3- g allate (епигалокатехин-3-галат)
FBS	F etal B ovine S erum (фетален телешки серум)
GAPDH	G lyceraldehyde-3- p hosphate d ehydrogenase (глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа)
HER2	H uman E pidermal growth factor R eceptor 2 (рецептор 2 за човешки епидермален растежен фактор)
IC ₅₀	Half Maximal Inhibitory Concentration (инхибиторна концентрация 50%)
MEM	M inimum E ssential M edium
MTT	3-(4,5- d imethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NEAA	Non-Essential Amino Acids (неесенциални аминокиселини)
qRT PCR	quantitative Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction (Количествена полимеразна верижна реакция след обратна транскрипция)
SEM	Standard error of the mean (стандартна грешка на средната стойност)

1. УВОД

Независимо от огромните усилия и постигнатия значителен напредък през последните десетилетия, честотата на възникване и броят на смъртните случаи, асоциирани с онкологичните заболявания, непрекъснато се повишават. Поради сложната природа на рака и силната вариабилност при отделните случаи, универсална ефективна терапия липсва. Налице е огромна необходимост от откриване и въвеждане в практиката на нови терапевтични възможности с по-висока ефективност и по-ниска токсичност от съществуващите.

През последните десетилетия природните продукти с растителен произход доминират сред източниците на нови профилактични и терапевтични средства. За повече от 3000 растителни вида е известно, че повлияват онкологичния процес, а редица антинеопластични агенти с растителен произход вече успешно се прилагат в клиничната практика. Все още обаче онкотерапевтичният потенциал на по-голямата част от растителните видове остава непроучен. Интересът е насочен към откриването на агенти с растителен произход, които избирателно да инхибират растежа на туморните клетки, без да вредят на организма. Уточняването на точните механизми и таргети на действие на антитуморните агенти е от критична важност за успешното им внедряване в клиничната практика.

Значителното многообразие и ценни биологични свойства на българските лечебни растения предоставят големи възможности в тази посока. Във връзка с това дисертационният труд има за цел да обогати наличните данни относно терапевтичните възможности на растителните ресурси чрез проучване на антитуморната активност на три лечебни растения от българската популация с широко приложение в народната медицина: *Cotinus coggygria* Scop. (смардлика), *Tanacetum vulgare* L. (вратига) и *Cichorium intybus* L. (цикория). Като моделна система в изследванията са използвани клетъчни линии, произхождащи от три от най-разпространените и свързани с най-висока смъртност онкологични заболявания при жените: рак на млечната жлеза (MCF7, T47D), рак на шийката на матката (HeLa) и рак на яйчниците (A2780). Селективността в действието на растенията е отчетена чрез съпоставяне с нетуморогенна клетъчна линия (MCF10A).

На анализ бяха подложени цитотоксичните и антипролиферативни свойства на тотални водно-етанолови екстракти и фракции от надземни части на растенията, както

и някои възможни механизми на антитуморния ефект, като блокиране прогресията на клетъчния цикъл и задвижване процесите на програмирана клетъчна смърт, индуциране на първични повреди в ДНК, и модулиране на епигенетични модификации.

Разработването на онкотерапевтични препарати е дълъг, трудоемък и многоетапен процес, включващ анализи на различни нива: клетъчни култури, експериментални модели с опитни животни, клинични изпитвания при хора. Проведените в настоящата разработка изследвания представляват първата стъпка от този процес. Получените данни допринасят за разширяване на познанията за биологичните ефекти на изследваните растителни видове и са предпоставка за задълбочаване на проучването на техния фармакологичен потенциал.

2. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Изследванията, реализирани в настоящия дисертационен труд, се базират на следната работна хипотеза:

Българските лечебни растения Cotinus coggygria Scop. (смадлика), Tanacetum vulgare L. (вратига) и Cichorium intybus L. (цикория) притежават:

- *антитуморна активност спрямо различни човешки туморни клетъчни линии, включително от рак на млечната жлеза, яйчниците и маточната шийка;*
- *селективно действие спрямо нетуморогенна човешка клетъчна линия*

Ракът на млечната жлеза, яйчниците и маточната шийка са сред най-често диагностицираните и причиняващи най-висока смъртност злокачествени заболявания при жените, както в световен мащаб, така и за България. Основни препятствия пред конвенционалното лечение на раковите заболявания представляват многобройните странични ефекти на лъче- и химиотерапията, устойчивостта на туморните клетки към действието на онкотерапевтичните агенти, както и възможността от рецидивирание на туморите.

Растителните ресурси са изключително перспективен източник за разработване на нови лекарствени препарати за терапия на широк спектър от болестни състояния, в това число и на злокачествените заболявания, поради способността им да редуцират тежките странични ефекти, да подобряват ефективността на химио- и лъчетерапията, да повишават акумулирането на лекарствените препарати и да понижават устойчивостта на раковите клетки спрямо тях. Редица антинеопластични агенти с растителен произход успешно се прилагат в онкотерапевтичния процес. Продължава да е налице обаче огромна необходимост от откриване и въвеждане в практиката на нови терапевтични агенти с по-висока ефективност и по-ниска токсичност от съществуващите. Уточняването на механизмите и прицелните молекули на действие на антитуморните агенти е от изключителна важност за успешното им прилагане.

Трите растения, обект на настоящото изследване, намират широка употреба в народната медицина, благодарение на ценните си биологични активности. Антитуморните им свойства обаче, макар и обещаващи, остават сравнително слабо

проучени. До този момент липсват данни за антитуморната активност на екстракти или фракции от смрадлика, вратига и цикория от българска растителна популация.

Във връзка с гореизложеното, в настоящата научна разработка бяха поставени следните цели:

1. Да се направи оценка на антитуморния потенциал на тотални екстракти и фракции от българските лечебни растения *Cotinus coggygria*, *Tanacetum vulgare* и *Cichorium intybus* върху човешки клетъчни линии от рак на млечната жлеза, яйчниците и маточната шийка. Да се съпостави действието на изследваните субстанции върху контролна нетуморогенна клетъчна линия;

2. Да се изследват някои основни механизми, отговорни за антитуморния ефект – блокиране на клетъчния цикъл, задвижване на програмираната смърт на клетката (апоптоза, автофагия), индуциране на първични повреди в ДНК, повлияване процеса на ДНК метилиране.

За реализирането на поставените цели бяха формулирани следните по-важни задачи:

1. Да се направи сравнителен анализ на *in vitro* инхибиторното действие на тотални екстракти и фракции от изследваните растения върху преживяемостта (цитотоксичен ефект) и пролиферацията (цитостатичен ефект) на туморни и нетуморогенни клетки след третиране с различни концентрации за различни времеви интервали. Да се определят IC_{50} стойностите за различните субстанции.

2. На базата на получените резултати относно цитотоксичните и цитостатичните свойства на изследваните екстракти/фракции, да се подберат субстанциите, проявяващи най-силен *in vitro* антитуморен ефект и селективност по отношение на нетуморогенните клетки, и да се получат данни за механизмите на антитуморното им действие:

2.1. Да се установи влиянието на подобрите екстракти/фракции върху фазите на клетъчния цикъл на туморни клетки;

2.2. Да се изследва апоптотичният потенциал на подобрите субстанции върху туморни клетки;

2.3. Да се установи дали субстанциите повлияват процеса на автофагия на туморните клетки;

2.4. Да се направи оценка на генотоксичния потенциал на субстанциите при въздействието им върху туморните клетки;

2.5. Да се проучи промяната в способността на туморните клетки да формират колонии след третиране с подбраните субстанции;

2.6. Да се направи оценка на измененията в термичните профили на туморните клетки под действие на субстанциите;

2.7. Да се изследва способността на субстанциите да повлияват някои епигенетични модификации, като метилирането на ДНК, в туморни клетки.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. Материали

3.1.1. Растителни екстракти

Водно-етанолните тотални екстракти от листа на *Cotinus coggygia* Scop., надземни части от *Tanacetum vulgare* L. и надземни части на *Cichorium intybus* L. ни бяха предоставени от фирма Vemo 99 Ltd (<http://www.vemo-vsv.com/bg/produkti/>). По данни на производителите, съдържанието на активни вещества на екстракта от смрадлика включва: полифеноли, изчислени като катехин (27 – 32% на сухо вещество); флавоноиди, изчислени като апигенин (не по-малко от 15% на сухо вещество); флавоноиди, изчислени като кверцетин (не по-малко от 2% на сухо вещество). За екстракта от вратига съставът на активни вещества включва флавоноиди, изчислени като апигенин (от 18 до 22%); кумарини, изчислени като ескулин (7.5 до 9%); дъбилни вещества, изчислени като танини (от 7.5 до 9%). При цикорията сред активните вещества са: кумарини, изчислени като ескулин (от 9 до 11%); флавоноиди, изчислени като апигенин (от 7 до 8.5%); дъбилни вещества, изчислени като таниин (от 4.5 до 5.5).

3.1.2. Клетъчни линии

Като моделна система в изследванията бяха използвани четири човешки туморни клетъчни линии от онкологични заболявания при жените (рак на млечната жлеза, яйчниците и маточната шийка) и човешка нетуморогенна контролна клетъчна линия, която притежава характеристиките на нормален гръден епител.

3.1.2.1. Туморни клетъчни линии

- MCF7 (ATCC, ECACC):
 - Произход: изолирана е през 1970 г. от плеврален ексудат на 69-годишна пациентка с метастатичен рак на млечната жлеза;
 - Първичен тумор: инвазивен дуктален карцином на млечната жлеза;
 - Клетъчен тип: луминален епител;
 - Експресия на рецептори: за естроген – ER⁺; за прогестерон – PR⁺; HER2⁻;
 - Време на удвояване: около 24 часа;
- T47D (ECACC):
 - Произход: изолирана е от плеврален ексудат на 54-годишна пациентка с метастатичен рак на млечната жлеза;

- Първичен тумор: инвазивен дуктален карцином на млечната жлеза;
- Клетъчен тип: луминален епител;
- Експресия на рецептори: за естроген – ER⁺; за прогестерон – PR⁺; HER2⁻;
- Време на удвояване: 32 часа;
- A2780 (ECACC):
 - Произход: изолирана е от туморна тъкан на пациент с овариален аденокарцином, непретърпял лечение;
 - Клетъчен тип: епител;
 - Време на удвояване: 13.5 часа;
- HeLa (ECACC):
 - Произход: изолирана е 1951 г. от 31-годишна пациентка (Henrietta Lacks) с цервикален карцином;
 - Клетъчен тип: епител;
 - Време на удвояване: около 24 часа;

3.1.2.2. Нетуморогенна клетъчна линия

- MCF10A (ATCC):
 - Произход: възникнала е спонтанно от смъртната MCF10, която произхожда от 36-годишна пациентка с фиброкистично заболяване на млечната жлеза;
 - Клетъчен тип: епител;
 - Време на удвояване: около 24 часа.

Линии MCF7 и MCF10A (American Type Culture Collection - ATCC, Manassas, VA, USA) са налични в Лаборатория „Геномна динамика и стабилност“ към ИФРГ-БАН. Линии MCF7, T47D, A7280 и HeLa (European Collection of Cell Cultures - ECACC, Salisbury, UK) ни бяха любезно предоставени за работа по време на специализация, проведена в Катедра „Фармакодинамика и биофармация“, Фармацевтичен факултет, Сегедски университет, Унгария.

3.2. МЕТОДИ

3.2.1. Получаване на фракции от тотален растителен екстракт

Процесът на фракциониране на тоталния водно-етанолов екстракт от *T. vulgare* до хлороформна и водно-метанолова фракции беше осъществен при специализация във Фармацевтичен факултет, Сегедски университет, Унгария, както и в ИБЕИ-БАН.

3.2.2. Клетъчно култивиране

При култивиране на туморните клетъчни линии MCF7, T47D, A2780 и HeLa беше използвана хранителна среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)/MEM (Minimal Essential Medium), с добавени към нея 10% фетален телешки серум (FBS), 1% натриев пируват и 1% MEM Non-Essential Amino Acids (NEAA), 1% антибиотичен-антимикотичен разтвор, а за нетуморогенната клетъчна линия MCF10A - DMEM, 5% фетален телешки серум (FBS), 1% натриев пируват, 1% MEM NEAA, 20 ng/ml човешки епидермален растежен фактор (hEGF), 10 µg/ml инсулин и 0.05 mM хидрокортизон. Клетките бяха инкубирани на 37°C при 5% CO₂ и висока влажност.

3.2.3. Тест с трипаново синьо

Аликвота от клетъчна суспензия беше смесена с равен обем 0.4% разтвор на багрилото трипаново синьо и под инверторен светлинен микроскоп, с помощта на хемцитометър, бяха преброени живите (неоцветени, с бистра цитоплазма) и мъртвите (оцветени в тъмносиньо) клетки.

3.2.4. МТТ анализ

За оценка на относителната клетъчна преживяемост и пролиферация беше използван МТТ анализ (*Mosmann, 1983*).

Анализът на клетъчната преживяемост се отчита на 24-тия час след третиране, тъй като това е времеви интервал, за който не може да се наблюдава съществена пролиферация на клетките и се оценява директният токсичен ефект на изследваната субстанция, водещ до клетъчна смърт, докато анализът на клетъчната пролиферация се провежда за 72 часа период на третиране. Стойностите на IC₅₀ концентрациите на растителните екстракти/фракции спрямо съответните клетъчни линии бяха изчислени с помощта на GraphPad Prism софтуер (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). За проследяване кинетиката на антитуморното действие, МТТ анализът беше проведен при третиране на клетките със съответната IC₅₀ концентрация за 24, 48 и 72 ч.

Получените данни са представени със средни стойности \pm стандартна грешка на средната стойност (SEM) от поне два отделни експеримента, всеки проведен в от три до пет повторения. Статистически значимите разлики в преживяемостта/пролиферацията между нетретираните контроли и третираните с различни концентрации проби бяха определяни посредством еднофакторен дисперсионен анализ ANOVA и последващ тест на Dunnett. За статистически значими се приемат резултатите при стойност на $p < 0.05$.

МТТ анализът на клетъчната пролиферация на туморните линии MCF7, T47D, A2780 и HeLa беше осъществен при специализация в Катедра „Фармакодинамика и биофармация“, Фармацевтичен факултет, Сегедски университет, Унгария.

МТТ анализът на клетъчната преживяемост и пролиферация беше проведен в широк диапазон от концентрации на изследваните екстракти/фракции. Границите, в които варираха приложените концентрации, бяха специфични за различните субстанции и бяха подбрани въз основа на предварителни експерименти, включващи по-големи концентрационни интервали, с цел точно установяване стойностите на IC_{50} .

3.2.5. Наблюдение на клетъчната морфология

Анализът при наблюдението на клетъчната морфология на MCF7 и MCF10A клетките беше синхронизиран с МТТ анализа на клетъчната преживяемост. Измененията в клетъчната морфология бяха наблюдавани под инверторен светлинен микроскоп.

3.2.6. Анализ на способността на туморните клетки да формират колонии (клоногенност)

При провеждане на теста за клоногенност, туморни клетки бяха третирани с различни концентрации на тотален екстракт от *C. coggygia* за период от 11 дни. Визуализацията на формираните колонии беше осъществена посредством багрене с метиленово синьо. Всеки експеримент от анализа беше повторен четири пъти, а всяка от анализираниите концентрации присъстваше в три повторения.

3.2.7. Алкален кометен анализ

Алкалният кометен анализ беше проведен съгласно методика, описана от *Georgieva u Stoilov (2008)*.

Анализът служи за измерване на честотата на скъсвания (едно- и двойноверижни) в ДНК на ниво единична клетка и беше осъществен след поставяне в

агарозен гел на третиранни за 24 ч и контролни туморни клетки, с последващо лизиране и електрофореза върху предметно стъкло (300 mA, 1 V/cm). Визуализацията на индуцираните повреди беше извършена след белязане с флуоресцентното багрило акридин оранж (АО) и наблюдение под флуоресцентен микроскоп (Zeiss Jenamed-2), снабден с дигитална камера (Samsung Digimax V50) и подходящи филтри (510 nm excitation filter). Въз основа на стойностите на параметрите се изчислява процентът на ДНК, мигрирала от главата на кометата в областта на опашката на кометата (*Anderson et al., 1994*).

Бяха анализирани повече от 50 ядра на слайд, като за всяка третирана и контролна проба бяха изследвани по два слайда на експеримент при двукратно повторение на експериментите. За статистическия анализ беше използвана програма SigmaSTAT (Systat Software, Inc.). Статистически значими различия между нетретираните контроли и третираните с различни концентрации на екстракта проби бяха определяни посредством Kruskal-Wallis тест, последван от тест на Dunnett. Стойности при $p < 0.05$ се определят като статистически значими.

3.2.8. Флоуцитометричен анализ

С цел установяване на апоптоза и анализ на клетъчния цикъл посредством измерване на съдържанието на клетъчната ДНК беше проведен флоуцитометричен анализ. Анализът включваше специфично оцветяване на туморни клетки, нетретиранни и третиранни с подбрани екстракти/фракции в определени концентрации за 24 и 72 часа, с флуоресцентно багрило пропидиев йодид и сортирането им в зависимост от техните характеристики. Клетките бяха анализирани с флоуцитометър CyFlow (Partec GmbH, Münster, Germany). Във всеки експеримент се анализират 20 000 клетки и процентното им разпределение в различните фази на клетъчния цикъл (G1, S и G2/M) се определя с помощта на програма ModFit LT (Verity Software House, Topsham, ME, USA). Частта от клетки от общата популация, която има съдържание на ДНК, по-малко от диплоидното (суб-G1-фракция), се означава като апоптотична клетъчна популация (*Nicoletti et al., 1991*).

Статистическата оценка на получените резултати беше осъществена посредством еднофакторен дисперсионен анализ ANOVA и последващ тест на Neumann-Keuls с помощта на GraphPad Prism 4 софтуер.

Флуцитометричният анализ беше проведен в Катедра „Фармакодинамика и биофармация“, Фармацевтичен факултет, Сегедски университет, Унгария.

3.2.9. Флуоресцентен микроскопски анализ

Необратими промени в морфологията на клетката, съпътстващи процесите на програмирана клетъчна смърт, могат да бъдат установени чрез флуоресцентна микроскопия. За анализ на процеса автофагия клетките се оцветяват с флуоресцентното багрило акридин оранж, като наличието на везикули с киселинно рН (автофаголизозоми) се установява по яркочервеното оцветяване под флуоресцентен микроскоп.

Нетретирани и третирани 24 часа с екстракт/фракция туморни клетки, белязани с АО, бяха наблюдавани под флуоресцентен микроскоп Olympus BX41. Използвани бяха два филтъра за флуоресцентен микроскоп: FITC (560-600nm) и Texas Red (595-605 nm).

3.2.10. Диференциална сканираща калориметрия

Анализът диференциална сканираща калориметрия (ДСК) регистрира изменения в клетъчните калориметрични профили (термограми), определени от термичните преходи на биологични молекули и комплексни системи.

Калориметричните профили на нетретирани и третирани за 24 ч туморни клетки бяха измерени с помощта на DASM 4 високочувствителен микрокалориметър в диапазона 30–120°C със скорост на сканиране 1°C/мин. Термограмите са анализирани със софтуерен пакет Origin.

ДСК беше осъществена съвместно с учени от секция „Биомакромолекули и биомолекулни взаимодействия“, ИБФБМИ-БАН.

3.2.11. Количествена полимеразна верижна реакция след обратна транскрипция (qRT-PCR)

Методът служи за определяне на нивата на генна експресия чрез флуоресцентно белязване, при което по интензитета на излъчването се установява количеството на амплифицирания продукт.

На анализ бяха подложени туморни и контролни нетуморогенни клетки, третирани за различни времеви интервали (3, 24, 48, 72 ч). Като контроли на всеки часови период, бяха използвани нетретирани клетки.

Изолиране на тотална РНК

Изолирането на тотална РНК беше извършено с GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific).

Пречистване на изолираната РНК от геномна ДНК

Изолираните РНК проби бяха третирани с DNase I (RNase-free DNase set, Qiagen) в разтвор, след което бяха пречистени отново посредством GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific). Получената тотална РНК беше оценена качествено чрез електрофоретичен анализ в 1.5% агарозен гел в 1xTAE буфер (50x: 0.04M Tris-ацетат, 0.002M EDTA).

Обратна транскрипция на РНК до комплементарна ДНК (кДНК)

Тотална РНК от всяка проба и съответната ѝ контрола, беше подложена на обратна транскрипция за получаване на комплементарна ДНК чрез First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) и неспецифични (random) хексамерни праймери.

Количествена полимеразна верижна реакция след обратна транскрипция (qRT-PCR)

Посредством количествен qRT-PCR анализ бяха изследвани експресионните нива на гените, кодиращи ДНК метилтрансферазните ензими (*DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b*) и гени за метил-СрG-свързващи белтъци (*MeCP2*, *MBD1*, *MBD2*, *MBD3* и *MBD4*) след третиране на туморни клетки от рак на млечната жлеза (PMЖ) и контролни клетки. Отчетена беше и експресията на референтните гени алдолаза (*Ald*), β -актин (β -*Actin*) и глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа (*GAPDH*). Олигонуклеотидните последователности на праймерите на проучваните гени са представени в Таблица 1 (*Kala et al., 2015; Müller et al., 2000*).

Таблица 1. Нуклеотидна последователност на праймери, използвани за qRT-PCR анализ

Ген	Последователност праймер F	Последователност праймер R
<i>DNMT1</i>	5'-TACCTGGACGACCCTGACCTC-3'	5'-CGTTGGCATCAAAGATGGACA-3'
<i>DNMT3a</i>	5'-TATTGATGAGCGCACAAGAGAGC-3'	5'-GGGTGTTCCAGGGTAACATTGAG-3'
<i>DNMT3b</i>	5'-GGCAAGTTCTCCGAGGTCTCTG-3'	5'-TGGTACATGGCTTTTCGATAGGA-3'
<i>MeCP2</i>	5'-ACTCCCCAGAATACACCTTGCTT-3'	5'-TGAGGCCCTGGAGGTCCT-3'
<i>MBD1</i>	5'-CCTGGGTGCTGTGAGAACTGT-3'	5'-TTGAAGGCAATTCTCTGTGCTC-3'
<i>MBD2</i>	5'-AGTCAAATCAGACCCACAACGAA-3'	5'-CATCTGATGCACTAAGTCSTTGTAGC-3'
<i>MBD3</i>	5'-GTATGGCTCAACACCACGCA-3'	5'-AGCATGTCCGCCATCAGC-3'
<i>MBD4</i>	5'-TCTAGTGAGCGCCTAGTCCCAG-3'	5'-TTCCAATTCCATAGCAACATCTTCT-3'
<i>Ald</i>	5'-CGCAGAAGGGGTCTCTGGTGA-3'	5'-GGTTCTCCTCGGTGTTCTCG-3'
β Actin 1	5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'
β Actin 2	5'-CAGAGCAAGAGAGGCATCCT-3'	5'-GTTGAAGGTCTCAAACATGATC-3'
<i>GAPDH</i>	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	5'-TCCACCCTGTTGCTGTA-3'

Количественото определяне на експресионните нива на анализирани гени беше извършено с Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific)/1x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis BioDyne). Амплификацията беше осъществена на апарат PikoReal™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc.) при следните условия: начална денатурация 10 мин. при 95°C, 40/45 цикъла – денатурация 30 сек. при 95°C, анилинг 30 сек. при 60°C, елонгация 45 сек. при 72°C, последвани от „крива на топене“ с температурна стъпка 0.3°C. Данните бяха анализирани чрез PikoReal Software версия 2.1 (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB). При всяка клетъчна линия за всеки ген беше изготвяна и стандартна крива за оценка на ефективността на амплификация на продукта в зависимост от концентрацията на матрицата и броя цикли, като за целта бяха приготвяни съответните серийни разреждания със стъпка 1:10.

За да се определи относителното ниво на експресия на всеки ген беше използвана формулата на Pfaffl (2001). Нивата на транскрипти в третираните проби бяха определени за всяка изследвана времева точка и съпоставени с тези на нетретираните контроли, инкубирани за същия времеви период, и приети за 1.

Получените данни са представени със средни стойности \pm SEM от поне три повторения от различни qRT-PCR опити от два независими експеримента на третиране, всеки включващ една или повече обратни транскрипции. Изключение правят единствено анализите на 48-мия час от третирането на нетуморогенните MCF10A клетки, при които бяха проведени повторения само в рамките на един експеримент на третиране. Статистически значими различия между нетретираните контроли и третираните проби бяха определяни посредством t-тест, като стойностите при $p < 0.05$ се определят като статистически значими.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Оценка на *in vitro* антитуморния потенциал на тотални екстракти и фракции от българските лечебни растения *Cotinus coggygia*, *Tanacetum vulgare* и *Cichorium intybus*

Проведените в рамките на дисертационния труд анализи следваха определена експериментална схема, която включваше няколко последователни етапа: 1) Скрининг за наличие на антитуморна активност на тотални екстракти и фракции от *Cotinus coggygia*, *Tanacetum vulgare* и *Cichorium intybus* върху туморни и контролна човешки клетъчни линии; 2) Подбор на екстрактите/фракциите, проявяващи висок *in vitro* антитуморен потенциал и селективност по отношение на нетуморогенните клетки; 3) Анализ на някои възможни молекулярни механизми в основата на антитуморното действие (Фиг. 1).

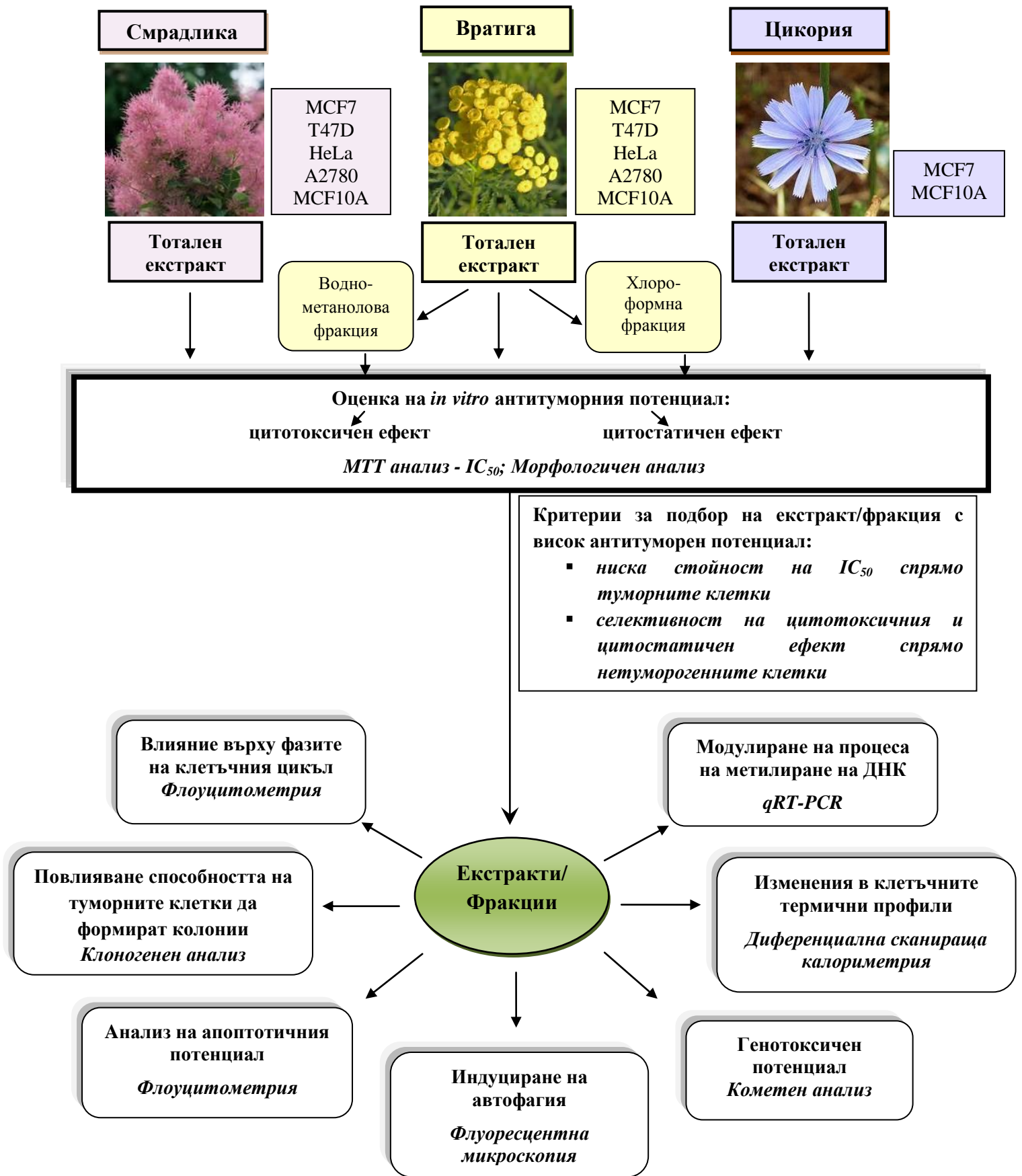
4.1.1. Анализ на цитотоксичните и антипролиферативни свойства

4.1.1.1. *Cotinus coggygia*

Цитотоксичен ефект

Първоначалният скрининг за наличие на антитуморни свойства на изследваните растителни екстракти беше извършен чрез МТТ анализ на клетъчната преживяемост на човешка туморна клетъчна линии от рак на млечната жлеза (MCF7). От съществено значение при провеждане на скринингови изследвания е тестваните субстанции да притежават висока селективност към туморните клетки без да увреждат нормалните клетки на организма. В тази връзка беше направен паралелен анализ на ефекта на изследваните екстракти върху контролна нетуморогенна клетъчна линия от гръден епител (MCF10A).

За силата на антитуморния ефект най-често се съди по стойността на IC_{50} (инхибиторна концентрация 50%) - концентрацията на изследваната субстанция, необходима за редуциране на преживяемостта до 50%. По-ниска стойност на IC_{50} обуславя по-силни антитуморни свойства на изследваното вещество.

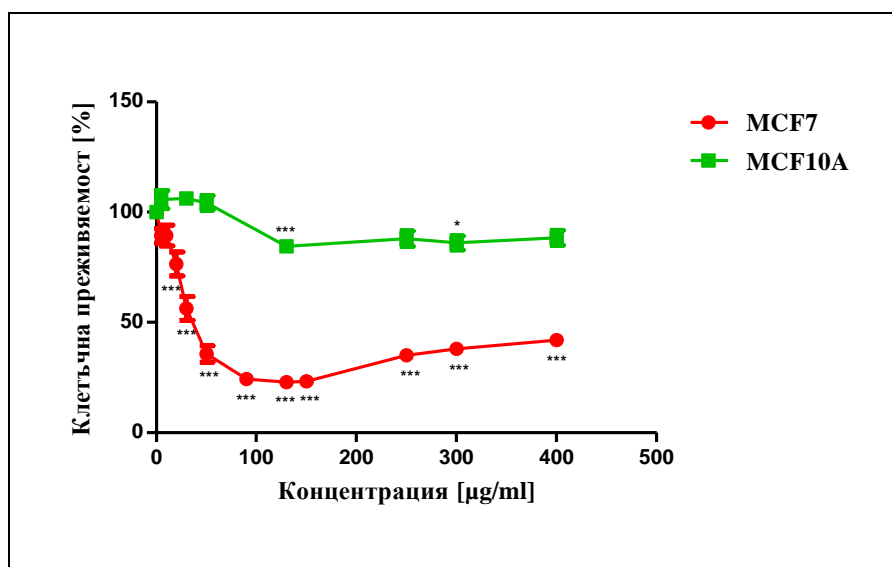


Фигура 1. Схема на последователните етапи на реализиране на научните задачи.

При скрининговите анализи беше използван МТТ тест, който представлява количествен, бърз и високо възпроизводим метод, подходящ за оценка на антитуморния ефект на широк диапазон от лечебни субстанции и лекарства. При провеждане на МТТ анализа на клетъчната преживяемост, туморната линия MCF7 беше подложена на третиране за 24 часа с тотален водно-етанолов листен екстракт от лечебното растение *Cotinus coggygia* в концентрации: 5, 10, 20, 30, 50, 90, 130, 150, 250, 300 и 400 µg/ml. Нетретирани MCF7 клетки, чиято преживяемост бе приета за 100%, бяха използвани като отрицателна контрола. Установено беше, че екстрактът редуцира значително преживяемостта на туморните клетки (Фиг. 2). При най-ниските изследвани инкубационни концентрации (5 µg/ml и 10 µg/ml) беше наблюдавано сравнително слабо инхибиране на преживяемостта (89.36% и 89.44% съответно), но при последващите нарастващи концентрации (от 20 µg/ml до 130 µg/ml) стойността на клетъчната преживяемост се понижи до голяма степен, като достигна стойност от 22.94%. Наблюдаваният цитотоксичен ефект на смрадликата върху MCF7 клетките не притежаваше дозова зависимост, тъй като при третиране с по-високи концентрации (в интервала 150 – 400 µg/ml), преживяемостта на MCF7 клетките показва тенденция към повишение (от 23.36% до 42.01%). Статистически значими различия ($p < 0.001$) в преживяемостта между нетретирани контроли и третираните проби бяха отчетени при всички тествани концентрации в диапазона от 20 до 400 µg/ml (Фиг. 2).

Посредством анализ на получените данни от МТТ теста на клетъчната преживяемост с помощта на GraphPad Prism 5 софтуер беше изчислена стойност на IC_{50} на екстракта от смрадлика за MCF7 клетките - 40.6 µg/ml.

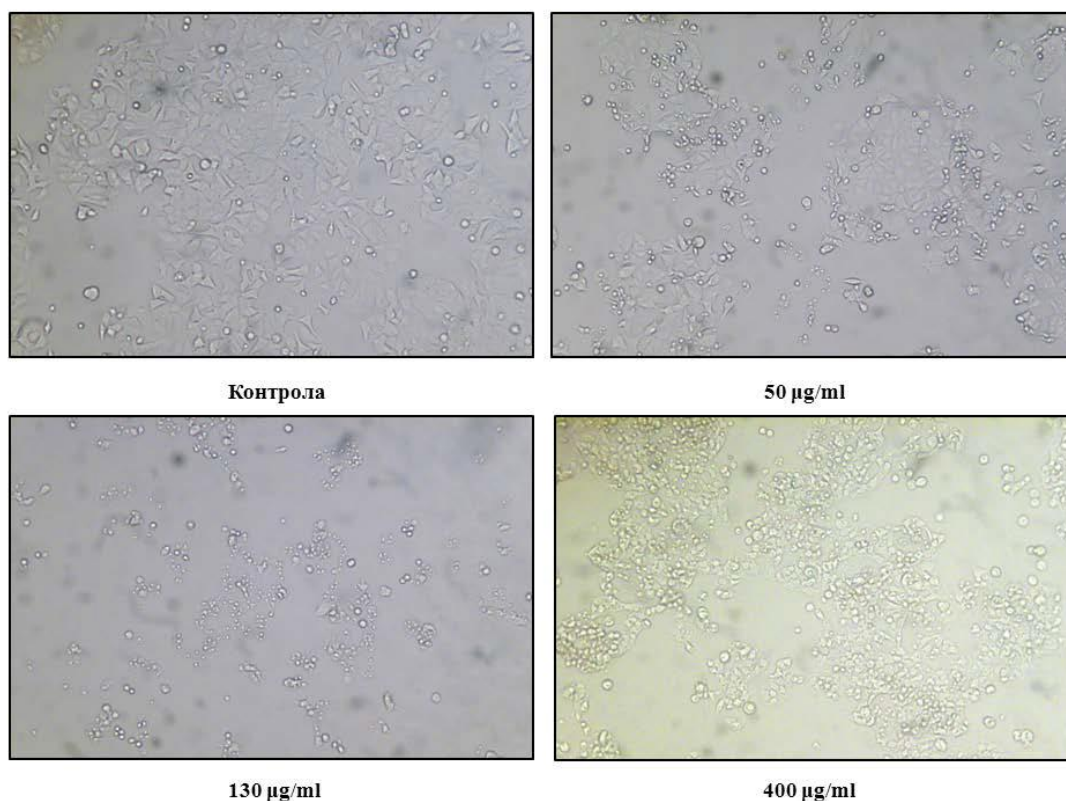
МТТ анализът на контролната нетуморогенна клетъчна линия MCF10A след третиране за 24 ч с концентрации на екстракта от *C. coggygia* от 5, 30, 50, 130, 250, 300, 400 µg/ml показва, че ефектът върху преживяемостта е слаб и не зависи експоненциално от приложената доза. В зоната на инхибиторна концентрация 50% за туморната клетъчна линия, преживяемостта на нетуморогенните клетки е със стойности леко надвишаващи 100%, а при стойности над 130 µg/ml преживяемостта им се понижава слабо без изразена дозова зависимост (Фиг. 2). Със статистическа значимост бяха разликите в преживяемостта между нетретирани контрола и третирана проба при приложени дози от 130 µg/ml ($p < 0.001$) и от 300 µg/ml ($p < 0.05$).



Фигура 2. МТТ анализ на клетъчната преживяемост на туморна клетъчна линия MCF7 и нетуморогенна клетъчна линия MCF10A, третирани за 24 ч с нарастващи концентрации на тотален екстракт от *Cotinus coggygia*; * и *** обозначават статистически значими разлики от контролата (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$). Данните са представени със средни стойности \pm стандартна грешка на средната стойност.

Сравнителният анализ на преживяемостта на туморната и нетуморогенната клетъчни линии показва, че разликата в преживяемостта на двете линии достига своята максимална стойност от 68.55% при концентрация 50 µg/ml. Това е концентрацията, при която преживяемостта на туморните клетки е възможно най-ниска - 35.71% при преживяемост на нетуморогенните клетки, най-близка до тази на контролните нетретирани клетки - 104.26%.

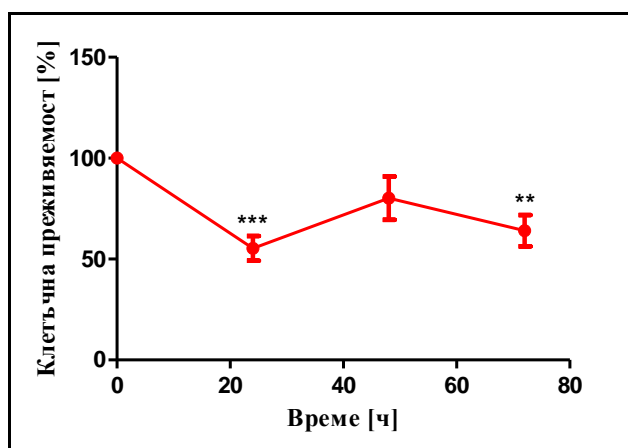
Визуализирането на измененията в морфологията на клетъчния монослой след третиране е достъпен и надежден подход при първоначалното проучване на антитуморните свойства на различни субстанции. Във връзка с това, паралелно с провеждането на МТТ анализа, под инверторен светлинен микроскоп бяха наблюдавани промени в морфологията на туморните клетки, изложени на действието на екстракта от смрадлика. Докато нетретирани контролни клетки запазват своята нормална форма, третирани се окръглят и намаляват обема си. Понижаването на броя адхерентни живи клетки, както и окръглянето и намаляването на размера на клетките следваха тенденцията, установена при МТТ анализа (Фиг. 3).



Фигура 3. Морфологични изменения на MCF7 клетки след третиране за 24 ч с 50 µg/ml, 130 µg/ml, и 400 µg/ml тотален екстракт от *Cotinus coggygia*, съпоставени с контрола от нетретирани клетки.

След въздействие с различни концентрации на екстракта върху нетуморогенните клетки не беше отчетена разлика в клетъчната морфология в сравнение с нетретираните клетки при нито една от приложените концентрации.

При следваща стъпка от проучването на антитуморните свойства на екстракта от смрадлика беше проследена кинетиката на антитуморния му ефект за периоди от 24, 48 и 72 часа след третиране с установената IC₅₀ концентрация (40.6 µg/ml). Получените резултати показаха, че инхибиторният ефект намалява с продължителността на третиране (Фиг. 4), като на 48-я час беше отчетено повишение в клетъчната преживяемост до 80.18%, а на 72-я час преживяемостта се понижи до 64.03% (стойност, по-висока от тази на 24-я час). Статистически значими различия между контролите и третираните с IC₅₀ проби бяха установени за 24-я час ($p < 0.001$) и 72-я час ($p < 0.01$).



Фигура 4. МТТ анализ на туморна клетъчна линия MCF7, третирана за 24, 48 и 72 ч с IC_{50} концентрация на тотален екстракт от *Cotinus coggygia*; ** и *** обозначават статистически значими разлики от контролата (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Данните са представени със средни стойности \pm стандартна грешка на средната стойност.

Антипролиферативен ефект

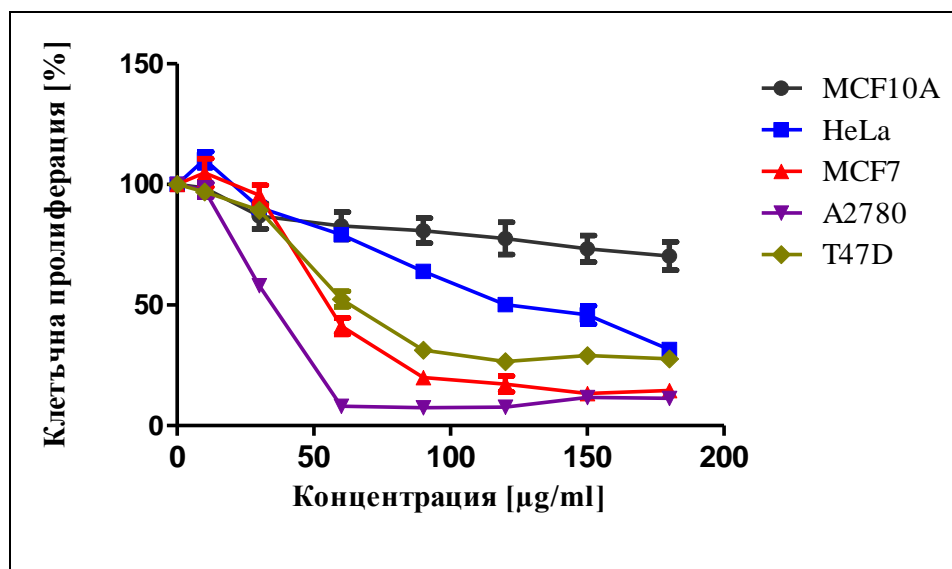
Получените първоначални резултати при проучването на антинеопластичния потенциал на тотален екстракт от *C. coggygia*, разкриващи наличие на значителен инхибиторен ефект върху преживяемостта на клетъчна линия от РМЖ MCF7 и слабо повлияване на преживяемостта на нетуморогенната линия MCF10A, ни дадоха основание да продължим и задълбочим изследванията чрез последващ анализ на антипролиферативните свойства на растението върху по-широк панел от туморни клетъчни линии.

За тази цел цитостатичният ефект на билковия екстракт беше оценен върху моделна система, включваща четири човешки клетъчни линии, представляващи онкологични заболявания на репродуктивната система при жените - РМЖ (MCF7, T47D), рак на шийката на матката (HeLa) и рак на яйчниците (A7280). Като контрола за селективността на антипролиферативния ефект отново беше използвана нетуморогенната линия MCF10A.

МТТ анализът на клетъчната пролиферация беше осъществен след излагане на клетките на действието на екстракта, приложен в концентрации 10, 30, 60, 90, 120, 150 и 180 $\mu\text{g/ml}$. След период на третиране от 72 часа тоталният екстракт от смрадлика демонстрира наличие на антипролиферативни свойства спрямо всички изследвани туморни клетъчни линии (Фиг. 5), като най-силен бе инхибиторният ефект върху пролиферацията на овариалните туморни клетки A2780 със стойност на IC_{50} 30.77

$\mu\text{g/ml}$. За MCF7, T47D и HeLa клетъчните линии бяха изчислени стойности за IC_{50} от 55.02 $\mu\text{g/ml}$, 61.08 $\mu\text{g/ml}$ и 122.7 $\mu\text{g/ml}$, съответно.

По отношение на най-чувствителната на действието на екстракта клетъчна линия - A2780, клетъчната пролиферация достигна най-ниска стойност от 7.42% при концентрация 90 $\mu\text{g/ml}$. От изследваните ракови клетъчни линии HeLa клетките от рак на маточната шийка показаха най-слаба чувствителност към екстракта от смрадлика и при най-високата концентрация (180 $\mu\text{g/ml}$) клетъчната пролиферация се понижи до 31.56%. При клетъчна линия HeLa беше наблюдавана дозова зависимост на антипролиферативния ефект, докато при останалите три туморни линии, при най-високите използвани концентрации се проследяваше слабо понижение на инхибиторния ефект на екстракта в сравнение с ефекта при някои по-ниски дози. Статистически значими различия в клетъчната пролиферация между нетретирани контроли и третирани проби за клетъчна линия A2780 бяха отчетени при всички концентрации от 30 до 180 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$), за клетъчна линия MCF7 – при концентрации в диапазона 60 - 180 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$), за T47D – при приложени дози от 30 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.01$) и в диапазона 60 – 180 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$) и за HeLa клетките – при всички използвани концентрации (10 и 30 $\mu\text{g/ml}$ - $p < 0.05$, от 60 до 180 $\mu\text{g/ml}$ - $p < 0.001$).



Фигура 5. МТТ анализ на клетъчни линии MCF10A, HeLa, MCF7, A2780 и T47D, третирани за 72 ч с нарастващи концентрации на тотален екстракт от *Cotinus coggygia*. Данните са представени със средни стойности \pm стандартна грешка на средната стойност.

При нетуморогенните MCF10A клетки беше наблюдавано слабо концентрационно-зависимо понижение на пролиферацията, в много по-ниска степен в сравнение с туморните клетки (Фиг. 5), като редуцията беше от 98.54% при концентрация 10 µg/ml до 70.28% при най-високата доза от 180 µg/ml. Извършеният статистически анализ показва значими разлики между контролните нетретирани и третирани клетки при концентрации от 120 до 180 µg/ml (120 µg/ml - $p < 0.05$, 150 µg/ml - $p < 0.01$ и 180 µg/ml - $p < 0.001$). При анализа не беше достигната редукция на пролиферацията до 50% за никоя от приложените концентрации ($IC_{50} > 180$ µg/ml).

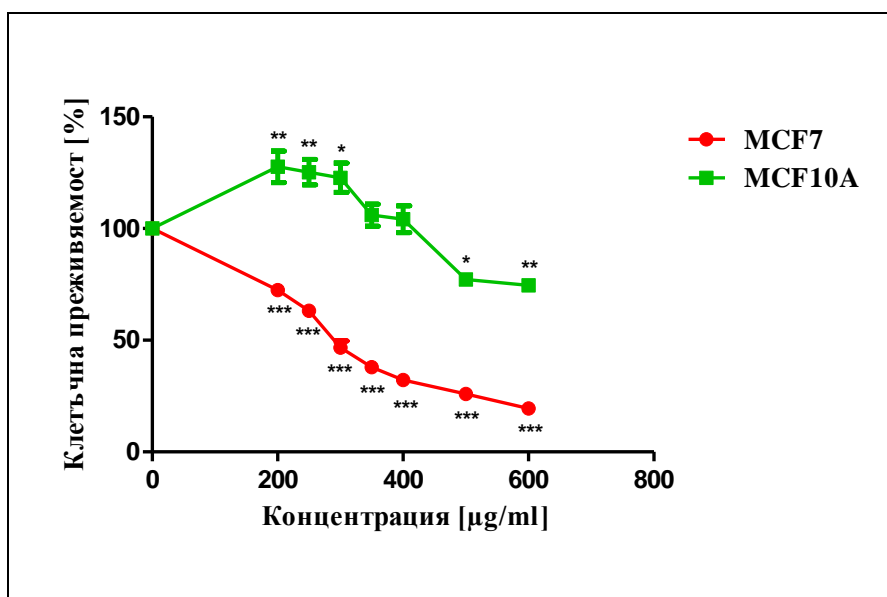
4.1.1.2. *Tanacetum vulgare*

Цитотоксичен ефект

Скринингът за антитуморен ефект на водно-етаноловия екстракт от надземни части от *Tanacetum vulgare* върху преживяемостта на клетките от туморната клетъчна линия MCF7 беше проведен чрез МТТ метода след третиране за 24 часа с концентрации 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600 µg/ml. Като контрола за оценка на селективността на цитотоксичното действие отново служеше нетуморогенната линия MCF10A.

Резултатите показаха, че екстрактът от вратига понижава в значителна степен и дозозависимо преживяемостта на туморните клетки (Фиг. 6). Клетъчната преживяемост от 72.43%, при третиране с концентрация 200 µg/ml, се редуцира с увеличаване на приложената доза и достига минимална стойност от 19.39% при концентрация 600 µg/ml. Статистически значими различия ($p < 0.001$) в отчетената преживяемост между нетретирани контроли и третирани проби бяха установени за всички изследвани концентрации.

Изчислено беше, че IC_{50} стойността за екстракта от *Tanacetum vulgare* се равнява на 286.8 µg/ml.



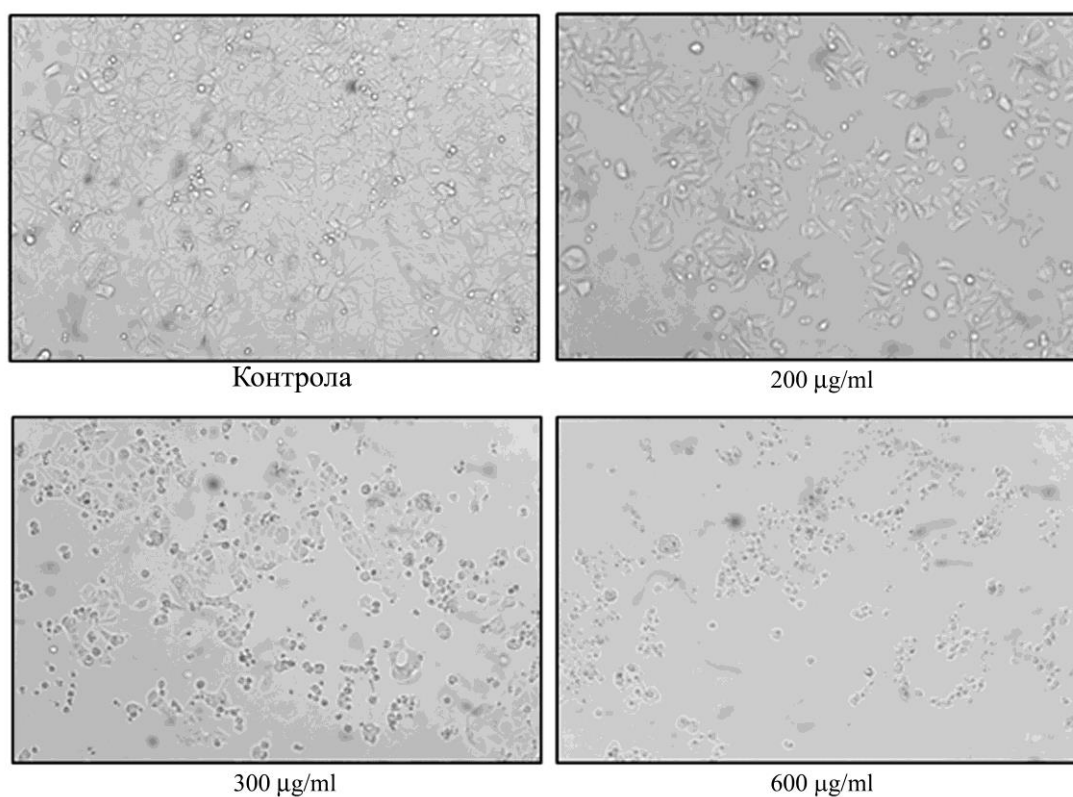
Фигура 6. МТТ анализ на клетъчната преживяемост на туморна клетъчна линия MCF7 и нетуморогенна клетъчна линия MCF10A, третирани за 24 ч с нарастващи концентрации на тотален екстракт от *Tanacetum vulgare*; *, ** и *** обозначават статистически значими разлики от контролата (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Данните са представени със средни стойности \pm стандартна грешка на средната стойност.

По отношение на влиянието на тоталния екстракт от вратига върху преживяемостта на контролната нетуморогенна линия от гръден епител беше наблюдаван значително по-слаб инхибиторен ефект (Фиг. 6). MCF10A клетките бяха третирани със същите концентрации, с които и туморните клетки (от 200 µg/ml до 600 µg/ml). За разлика от MCF7 клетките, при които преживяемостта се понижава значително и дозозависимо, при MCF10A тя показва стойности над 100% при инкубиране с концентрации на изследвания екстракт до 400 µg/ml. В диапазона, обхващащ инхибиторната концентрация IC_{50} , установена за туморните клетки (286.8 µg/ml), преживяемостта на нетуморогенните възлиза на 125.26% (250 µg/ml) и 122.71% (300 µg/ml). При най-високите приложени концентрации преживяемостта на контролните клетки пада под 100%, като най-ниска стойност достига при 600 µg/ml (74.51%). Установени бяха статистически значими разлики на третираните проби от контролата при концентрация 200, 250 и 600 µg/ml ($p < 0.01$) и при концентрации 300 и 500 µg/ml ($p < 0.05$).

Селективният ефект на екстракта от вратига върху клетъчната преживяемост, наблюдаван при съпоставяне на резултатите от МТТ анализа за туморната и контролната клетъчни линии, най-добре се илюстрира при третиране с концентрация

400 $\mu\text{g/ml}$, при която клетъчната преживяемост на двете линии достига разлика от 71.94% (преживяемостта на туморните клетки е 32.25 %, а тази на нетуморогенните клетки – 104.19%).

Наблюдаваните под светлинен микроскоп изменения в клетъчната морфология и монослой при туморните клетки потвърдиха резултатите от МТТ анализа на клетъчната преживяемост (Фиг. 7). След третиране с концентрации над 250 $\mu\text{g/ml}$ беше наблюдавано значително редуциране броя на живите адхерентни клетки и повишаване броя на отделените от монослоя мъртви клетки с повишаване концентрацията на третиране.

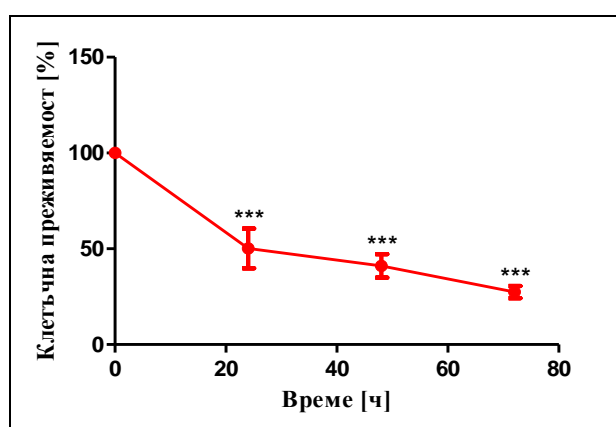


Фигура 7. Морфологични изменения на MCF7 клетки след третиране за 24 ч с 200 $\mu\text{g/ml}$, 300 $\mu\text{g/ml}$ и 600 $\mu\text{g/ml}$ тотален екстракт от *Tanacetum vulgare*, съпоставени с контрола от нетретиранни клетки.

По отношение на нетуморогенните клетки, светлинно-микроскопските наблюдения, проведени успоредно с МТТ анализа, потвърдиха получените резултати, като не показаха наличие на морфологични изменения след третиране с концентрациите от 200 до 400 $\mu\text{g/ml}$. Слабо окръгляне на клетките се отчете само след

въздействие с най-високите концентрации (500 и 600 $\mu\text{g/ml}$) на екстракта, при които беше наблюдавано понижаване на клетъчната преживяемост.

С цел проследяване на промяната на антитуморното действие на екстракта от вратига с времето, на следващия етап от проучването, туморните клетки MCF7 бяха третирани за 24, 48 и 72 часа с IC_{50} концентрацията на екстракта (286.8 $\mu\text{g/ml}$). МТТ анализът установи времезависимо понижаване на клетъчната преживяемост, като на 48 ч тя достигна стойност от 41.07%, а на 72 ч - 27.39% (Фиг. 8). Статистически значими различия ($p < 0.001$) в преживяемостта между нетретирани контроли и третирани с IC_{50} доза клетки бяха установени за всички изследвани времеви интервали.



Фигура 8. МТТ анализ на туморна клетъчна линия MCF7, третирана за 24, 48 и 72 ч с IC_{50} концентрация на тотален екстракт от *Tanacetum vulgare*; *** обозначава статистически значими разлики от контролата (***) $p < 0.001$). Данните са представени със средни стойности \pm стандартна грешка на средната стойност.

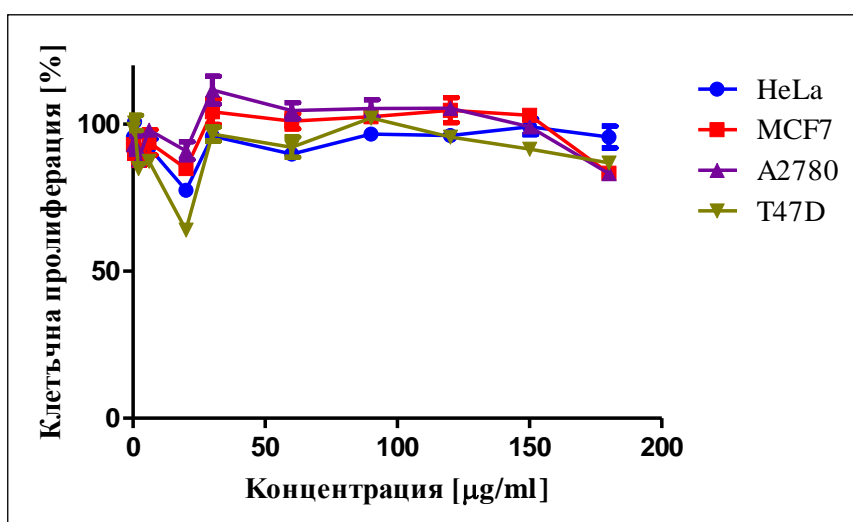
Антипролиферативен ефект

Получените резултати за наличие на значителен концентрационно- и времезависим цитотоксичен потенциал на тоталния екстракт от българското лечебно растение *T. vulgare* бяха основание за насочване на изследванията към оценка на антипролиферативния капацитет на екстракта върху клетъчни линии от рак на млечната жлеза, рак на маточната шийка и рак на яйчниците (MCF7, T47D, HeLa, A2780).

Проведен беше МТТ анализ, включващ третиране на гореспоменатите туморни клетъчни линии за 72 часа с концентрации на тоталния екстракт от вратига, вариращи в широк диапазон: 0.2, 0.6, 2, 6, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180 $\mu\text{g/ml}$.

При нито една от клетъчните линии, подложени на анализ след третиране с продължителност 72 часа, не беше достигнато редуциране на клетъчната преживяемост

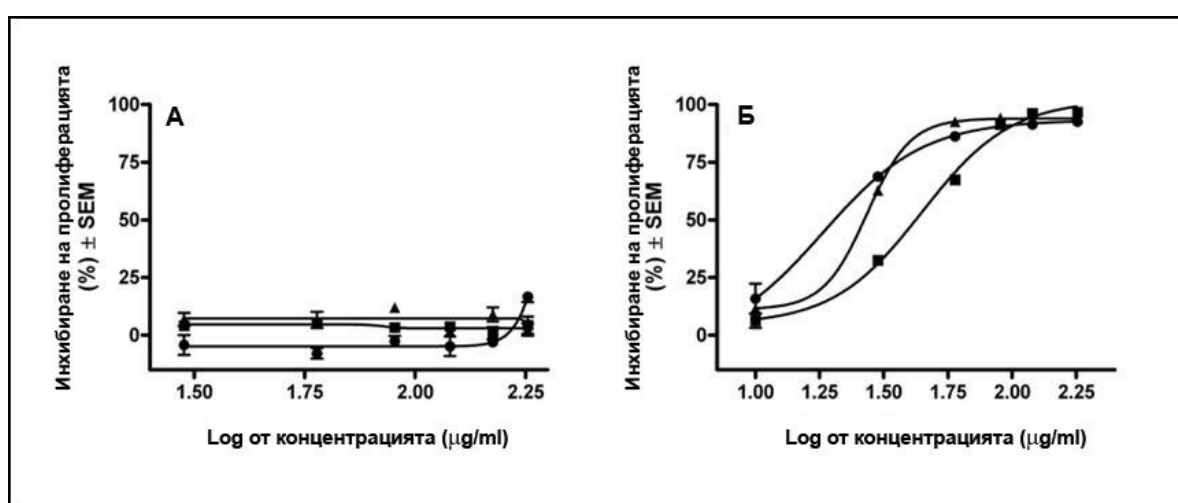
до 50% (Фиг. 9). Най-съществено понижение на клетъчната пролиферация беше регистрирано за клетъчна линия T47D, при която след третиране с концентрация от 20 $\mu\text{g/ml}$, пролиферацията достигна стойност от 64.05%. При изследваните клетъчни линии не беше отчетена концентрационна зависимост на инхибиторния ефект на екстракта. Статистически значими разлики в стойностите на клетъчна пролиферация за нетретирана контрола и третирана проба бяха отчетени по отношение на MCF7 клетките при концентрации от 20 $\mu\text{g/ml}$ и 180 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.01$), за клетъчна линия T47D при дози от 2 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.01$), 6 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$), 20 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$) и 180 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.01$), за HeLa - при 20 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$) и 60 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.01$), а за A2780 – при 2 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$) и 180 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.01$).



Фигура 9. МТТ анализ на клетъчни линии HeLa, MCF7, A2780 и T47D, третирани за 72 ч с нарастващи концентрации на тотален екстракт от *Tanacetum vulgare*. Данните са представени със средни стойности \pm стандартна грешка на средната стойност.

Получените резултати при оценката на цитостатичния потенциал на екстракта и фактът, че прилагането на концентрации до 180 $\mu\text{g/ml}$ не понижава клетъчната пролиферация до 50%, ни насочиха като следваща стъпка от изследването да подложим тоталния екстракт от *T. vulgare* на фракциониране, с цел изследване на антинеопластичния капацитет на получените фракции. Във връзка с това беше проведено фракциониране на екстракта с помощта на органични разтворители до водно-метанолова и хлороформна фракции, чиито антипролиферативни свойства бяха анализирани върху туморните клетъчни линии MCF7, A2780 и HeLa. При подлагане на туморните клетки на МТТ анализ след продължителност на третиране от 72 часа с двете фракции в концентрации 10, 30, 60, 90, 120 и 180 $\mu\text{g/ml}$ беше установено, че

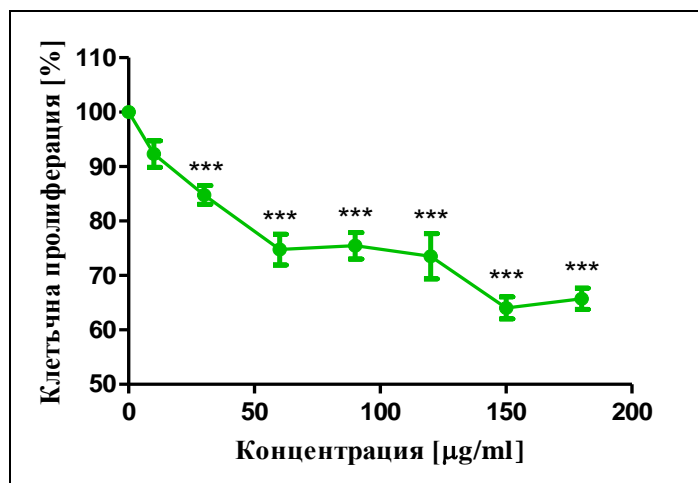
водно-метаноловата фракция повлиява слабо клетъчния растеж, докато хлороформната фракция показва значителен цитостатичен ефект върху всички изследвани ракови линии, като най-силен ефект бе наблюдаван при клетъчната линия от РМЖ MCF7 (Фиг. 10). По отношение на хлороформната фракция инхибиторният ефект върху клетъчната пролиферация за трите ракови клетъчни линии варираше в диапазон от 6.4 - 15.9% при най-ниската приложена концентрация от 10 $\mu\text{g/ml}$ до 92.6 - 96.7% при най-високата доза от 180 $\mu\text{g/ml}$. Най-ниска стойност на IC_{50} (27.98 $\mu\text{g/ml}$) на хлороформната фракция беше изчислена за MCF7 клетките, докато за A2780 и HeLa - бяха регистрирани малко по-високи стойности за инхибиторна концентрация 50% - 37.53 $\mu\text{g/ml}$ и 47.72 $\mu\text{g/ml}$, съответно.



Фигура 10. Антипролиферативен ефект на водно-метанолова (А) и хлороформна (Б) фракции на екстракт от *Tanacetum vulgare* върху клетъчни линии MCF7 (●), HeLa (■) и A2780 (▲), третирани за 72 ч, установен чрез МТТ анализ. Данните са представени със средни стойности \pm стандартна грешка на средната стойност.

Изследванията на ефекта на хлороформната фракция от вратига върху пролиферацията на нетуморогенната клетъчна линия след третиране с дози в интервала от 10 до 180 $\mu\text{g/ml}$ демонстрираха значително по-слабо повлияване на клетъчния растеж в сравнение с туморните клетки (Фиг. 11). Най-съществено понижение на растежа на MCF10A клетките до 63.96% се достигна едва при концентрация 150 $\mu\text{g/ml}$. В изследвания концентрационен диапазон не попадеше IC_{50} , тъй като редукция на пролиферацията до 50% не беше наблюдавано за никоя от приложените концентрации ($\text{IC}_{50} > 180 \mu\text{g/ml}$). При концентрация 30 $\mu\text{g/ml}$, която е най-близка до установените за раковите клетъчни линии стойности на IC_{50} , пролиферацията при нетуморогенната клетъчна линия се равняваше на 84.76%. Статистически значими различия на

третираната проба от контролата бяха установени в концентрационния интервал 30 – 180 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$).

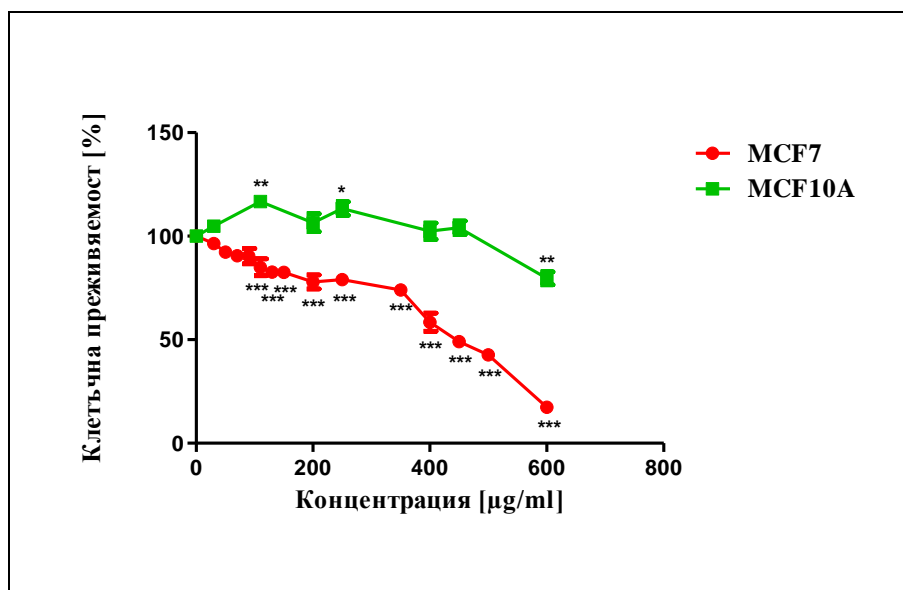


Фигура 11. МТТ анализ на клетъчна линия MCF10A, третирана за 72 ч с нарастващи концентрации на хлороформна фракция на екстракт от *Tanacetum vulgare*; *** обозначава статистически значими разлики от контролата (***) $p < 0.001$). Данните са представени със средни стойности \pm стандартна грешка на средната стойност.

4.1.1.3. *Cichorium intybus*

Цитотоксичен ефект

Скринингът за наличие на антитуморна активност на тоталния водно-етанолов екстракт от надземни части на *Cichorium intybus*, проведен посредством МТТ анализ на преживяемостта на туморни клетки от линията MCF7 след третиране с дози от екстракта 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 200, 250, 350, 400, 450, 500, 600 $\mu\text{g/ml}$ за 24 часа, показва незначително инхибиране на клетъчната преживяемост в ниските и средните стойности на изследваните концентрации (Фиг. 12). Едва при по-високите концентрации (над 350 $\mu\text{g/ml}$) беше установена по-значителна редукция в преживяемостта, достигаща минимална стойност от 17.30% при 600 $\mu\text{g/ml}$. Инхибиторната концентрация 50% беше изчислена на 428.9 $\mu\text{g/ml}$. Отчетените стойности на клетъчна преживяемост при МТТ анализа за третираните туморни клетки, съпоставени спрямо нетретираната контрола, бяха статистически значими при концентрации от 110 $\mu\text{g/ml}$ до 600 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$).



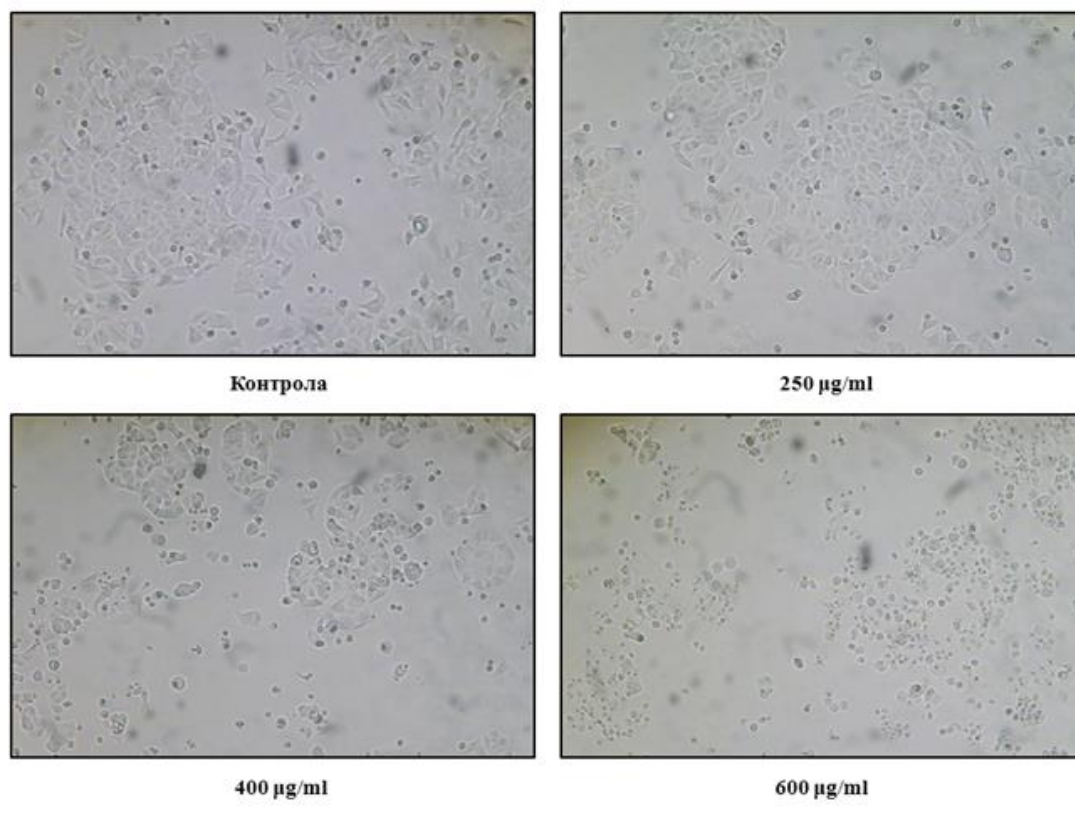
Фигура 12. МТТ анализ на клетъчната преживяемост на туморна клетъчна линия MCF7 и нетуморогенна клетъчна линия MCF10A, третирани за 24 ч с нарастващи концентрации на тотален екстракт от *Cichorium intybus*; *, ** и *** обозначават статистически значими разлики от контролата (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Данните са представени със средни стойности \pm стандартна грешка на средната стойност.

По отношение на MCF10A клетките, тоталният екстракт от цикория прояви слаб стимулиращ преживяемостта ефект при почти всички приложени концентрации, който не следваше концентрационна зависимост (Фиг. 12). В диапазона между 400 $\mu\text{g/ml}$ и 450 $\mu\text{g/ml}$, обхващащ установената за туморната линия IC_{50} концентрация, клетъчната преживяемост на нетуморогенната е близка до 100%. Единствено при най-високата изследвана концентрация (600 $\mu\text{g/ml}$) екстрактът понижава клетъчната преживяемост до 79.6%. Статистически значима разлика спрямо нетретирания контрола беше отчетена само при приложени дози от 110 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.01$), 250 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$) и 600 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.01$).

Съпоставката на резултатите, получени от МТТ анализа на клетъчната преживяемост за туморната и нетуморогенната клетъчни линии, показва, че при концентрацията на екстракта от 450 $\mu\text{g/ml}$, преживяемостта на нетуморогенната клетъчна линия е близо до 100% (104.08%), тази на туморната линия е 49.03%, като разликата между тях е 55.05%.

Морфологичното наблюдение под светлинен микроскоп потвърди очертаната от МТТ анализа тенденция на засилване на инхибиторния ефект на екстракта от цикория върху преживяемостта на туморните клетки при третиране с концентрации над 400

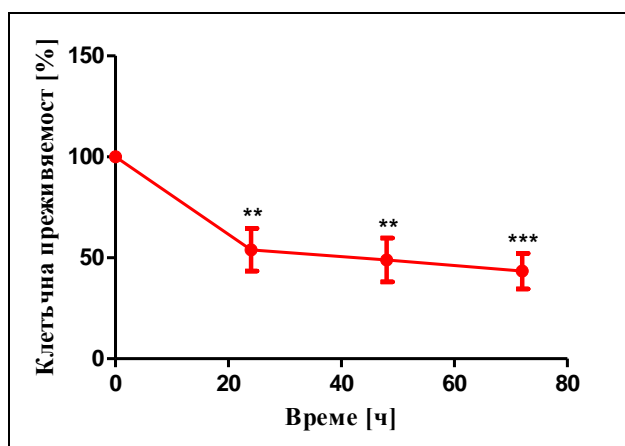
$\mu\text{g/ml}$ (Фиг. 13). Установено беше повишаване на броя клетки с видимо намален обем и окръглена форма, адхерентни или отделени от монослоя.



Фигура 13. Морфологични изменения на MCF7 клетки след третиране за 24 ч с 250 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$ и 600 $\mu\text{g/ml}$ тотален екстракт от *Cichorium intybus*, съпоставени с контрола от нетретирани клетки.

Светлинно-микроскопските изследвания не показаха морфологични изменения в MCF10A клетки при повишаване дозите на приложения екстракт спрямо нетретираните контролни клетки. Наблюдавано беше единствено слабо понижаване на плътността на клетъчния монослой.

Екстрактът от цикория демонстрира, макар и слабо, времезависимо понижение на преживяемостта на туморните клетки с повишаване периода на третиране. След инкубиране с IC_{50} концентрацията на 48-мия час клетъчната преживяемост беше редуцирана незначително до 48.91%, а на 72-я - до 43.38% (Фиг. 14). Отчетени бяха статистически значими разлики между данните за нетретираните контроли и данните, получени за всеки от времевите интервали (за 24-я и 48-я час - $p < 0.01$, а за 72-я - $p < 0.001$).



Фигура 14. МТТ анализ на туморна клетъчна линия MCF7, третирана за 24, 48 и 72 ч с IC_{50} концентрация на тотален екстракт от *Cichorium intybus*; ** и *** обозначава статистически значими разлики от контролата (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Данните са представени със средни стойности \pm стандартна грешка на средната стойност.

Тоталният водно-етанолов екстракт от надземни части на *C. intybus* показва наличие на цитотоксична активност спрямо туморна клетъчна линия MCF7 от рак на млечната жлеза и селективен ефект по отношение на нетуморогенната линия от гръден епител MCF10A, но поради по-високата стойност на инхибиторна концентрация 50% в сравнение с останалите изследвани екстракти той не беше подложен на анализ за антипролиферативен потенциал.

4.1.2. Подбор на екстракти/фракции с най-висок антитуморен потенциал

Анализите за оценка на *in vitro* антитуморните свойства на гореописаните екстракти и фракции от трите български лечебни растения позволиха да бъде направен подбор на най-перспективните за последващи изследвания субстанции, които да бъдат използвани за анализ на някои възможни механизми на антитуморното им действие. Използваните от нас критерии за селекция на растителни екстракти/фракции с висок антитуморен потенциал бяха съсредоточени върху следните показатели:

- ниска стойност на IC_{50} спрямо туморните клетки
- селективност на цитотоксичния и цитостатичен ефект спрямо нетуморогенните клетки.

По отношение на IC_{50} стойността на клетъчната преживяемост спрямо туморните клетки MCF7, тоталният екстракт от *Cotinus coggygria* демонстрира най-ниска стойност (40.6 $\mu\text{g/ml}$), в сравнение екстрактите от *Tanacetum vulgare* (286.8 $\mu\text{g/ml}$)

и *Cichorium intybus* (428.9 µg/ml). И трите екстракта проявиха висока селективност в действието си.

Поради по-високата стойност на инхибиторна концентрация 50%, установена за екстракта от *C. intybus*, в сравнение с останалите два растителни екстракта, по-детайлни проучвания с него не бяха проведени.

В последващите анализи за проучване на цитостатичните качества на тоталните екстракти от *C. corymbosum* и *T. vulgare*, този от смрадлика показва по-висок инхибиторен ефект върху туморните клетки, с най-силно действие върху A2780 и MCF7 клетките (IC₅₀ - 30.77 µg/ml и 55.02 µg/ml, съответно) и висока селективност по отношение на контролните MCF10A клетки. Тоталният екстракт от вратига беше подложен на фракциониране до водно-метанолна и хлороформна фракции, като за хлороформната фракция беше установен значителен антипролиферативен потенциал, с най-висока активност спрямо MCF7 клетките (IC₅₀ - 27.98 µg/ml) и подчертано по-слабо влияние върху растежа на нетуморогенната клетъчна линия.

Въз основа на получените резултати, като най-перспективен за следващи анализи беше подбран тоталният екстракт от *C. corymbosum*. Този екстракт беше обект на по-нататъшни проучвания за разкриване на някои механизми на антитуморното действие при клетъчните линии, показващи най-висока чувствителност спрямо него - A2780 и MCF7. Установеният значителен антипролиферативен ефект на хлороформната фракция на екстракта от *T. vulgare* ни послужи като предпоставка за извършване на някои първоначални изследвания върху молекулните механизми, обуславящи антитуморните ѝ свойства спрямо клетъчната линия с най-висока чувствителност към нея - MCF7.

4.2. Изследване на молекулярни механизми на антитуморното действие на български лечебни растения

4.2.1. Механизми на антитуморно действие на тотален екстракт от *Cotinus coggygria*

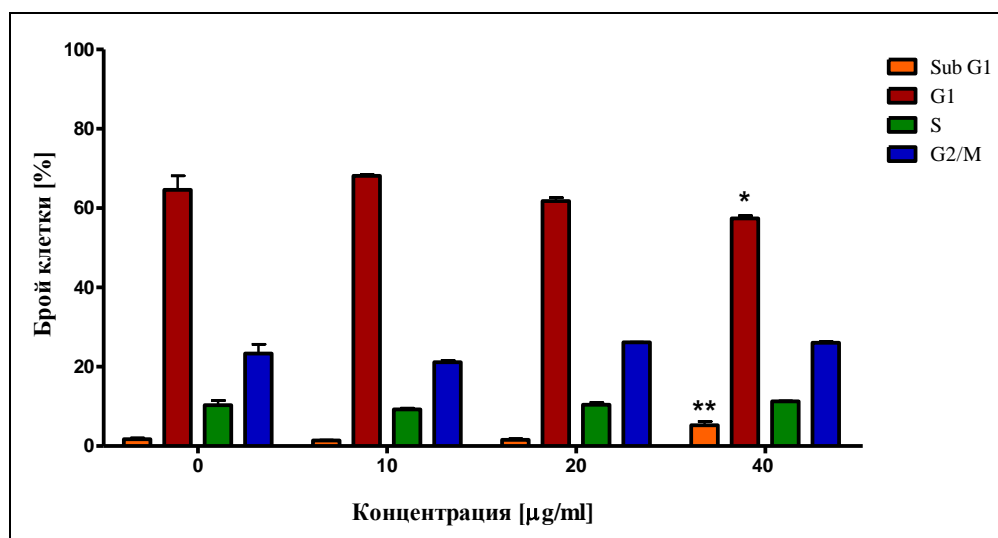
4.2.1.1. Повлияване на баланса клетъчна пролиферация/клетъчна смърт

Модулирането на прогресията на клетъчния цикъл посредством различни природни агенти придобива все по-засилен научен интерес по отношение на регулацията на растежа и пролиферацията на раковите клетки. Основни механизми за

реализиране на антитуморния ефект под действие на природните продукти се свързват с инициране на програмирана клетъчна смърт и с потискане на клетъчната пролиферация.

Флуоцитометричният анализ за оценка на разпределението на A2780 клетките в различните фази на клетъчния цикъл под действие на тотален водно-етанолов екстракт от листа на *C. coggygia*, беше проведен след третиране с концентрации на екстракта от 10, 20 и 40 $\mu\text{g/ml}$ за период от 72 часа. Получените резултати разкриха статистически значимо нарастване ($p < 0.01$) на броя клетки от хиподиплоидната (суб-G1) клетъчна популация, представляваща клетките в апоптоза, след третиране с концентрация на екстракта 40 $\mu\text{g/ml}$ в сравнение с контрола от нетретирани клетки, както и статистическо значимо редуциране ($p < 0.05$) на броя на A2780 клетките в G1-фазата при същата концентрация в сравнение с контролата (Фиг. 15).

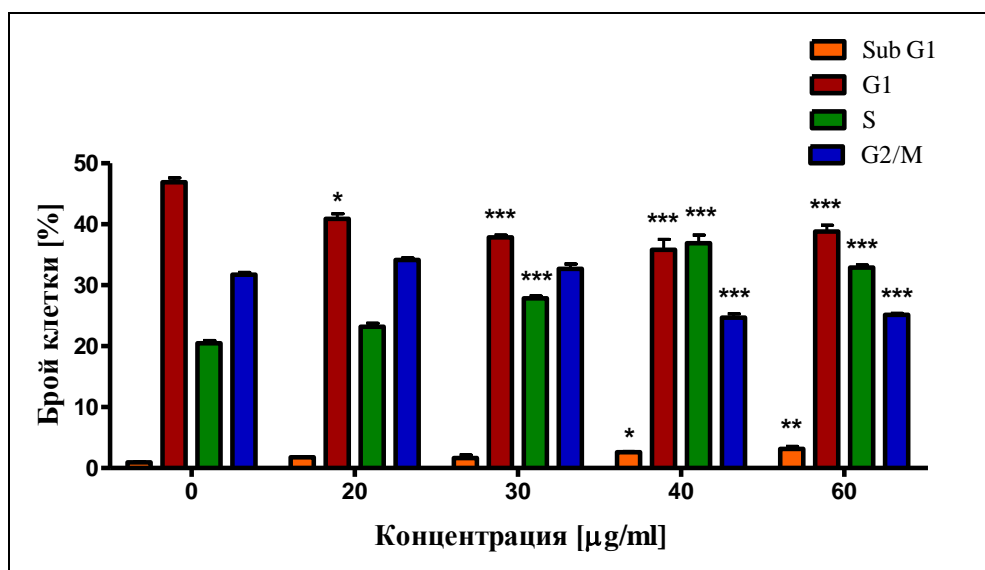
Данните от проведения анализ показват наличие на проапоптотична активност на екстракта от *C. coggygia* в клетъчна линия от рак на яйчниците A2780.



Фигура 15. Флуоцитометричен анализ след белязане с пропидиев йодид на ефекта на тотален екстракт от *Cotinus coggygia* върху разпределението на фазите на клетъчния цикъл на A2780 клетки, третирани за 72 ч с концентрации 10, 20 и 40 $\mu\text{g/ml}$. Показани са съответните стандартни грешки на средната стойност. * и ** обозначават статистически значими разлики от контролата (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Анализ на клетъчния цикъл посредством флуоцитометрия беше проведен и за MCF7 клетки от рак на млечната жлеза след третиране с екстракт от *C. coggygia* в концентрации 20, 30, 40, 60 $\mu\text{g/ml}$ за 24 часа. Наблюдавано беше, че след третиране с екстракта при линия MCF7 се променя процентното разпределение на клетките в

различните фази на клетъчния цикъл (Фиг. 16). Статистически значимо повишаване на броя на клетките от суб-G1-фракцията спрямо нетретираниите контроли беше установено при третиране на туморните клетки с концентрации 40 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$) и 60 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.01$). Едновременно с това беше наблюдавано и статистически значимо понижаване в процентното съотношение на клетките в G1-фазата на клетъчния цикъл при всички използвани концентрации (за концентрация 20 $\mu\text{g/ml}$ - $p < 0.05$; при 30, 40 и 60 $\mu\text{g/ml}$ - $p < 0.001$), повишаване на броя на клетки в S-фазата на клетъчния цикъл при концентрации на екстракта от 30 $\mu\text{g/ml}$ до 60 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$) и намаляване на броя на G2/M-клетките спрямо контролата след третиране с 40 $\mu\text{g/ml}$ и 60 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$).

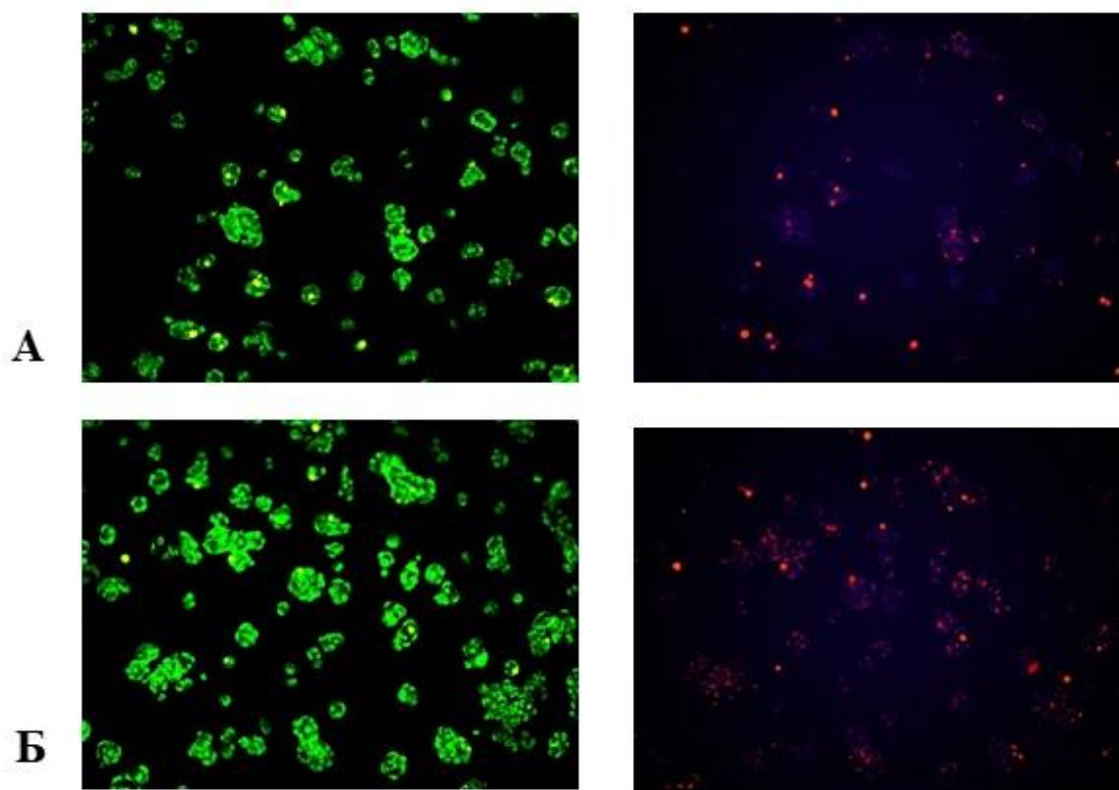


Фигура 16. Флоуцитометричен анализ след белязане с пропидиев йодид на ефекта на тотален екстракт от *Cotinus coggygia* върху разпределението на фазите на клетъчния цикъл на MCF7 клетки, третирани за 24 ч с концентрации 20, 30, 40 и 60 $\mu\text{g/ml}$. Показани са съответните стандартни грешки на средната стойност. *, ** и *** обозначават статистически значими разлики от контролата (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$).

Флоуцитометричните анализи показаха, че тоталният екстракт от смрадлика нарушава клетъчния цикъл, като го задържа в S-фазата, и индуцира апоптоза в MCF7 клетки след 24-часов период на третиране.

Като следващ етап от изследванията беше проведен флуоресцентно-микроскопски анализ с цел детекция на индуциране на процеса на програмираната клетъчна смърт автофагия в туморните клетки под действието на екстракта от *C. coggygia*. MCF7 клетки бяха третирани за 24 ч с екстракт от смрадлика в концентрация, съответстваща на IC_{50} (40.6 $\mu\text{g/ml}$). Клетките бяха оцветени с флуоресцентното багрило акридин оранж, като яркочервеното оцветяване под

флуоресцентен микроскоп бе индикация за наличие на везикули с киселинно рН (автофаголизозоми). При изследването беше наблюдавана тенденция за известно повишаване броя на клетките, при които е индуциран процесът автофагия след третиране с екстракта от смрадлика в сравнение с нетретираните контроли (Фиг. 17).



Фигура 17. Флуоресцентно-микроскопски анализ след бояване с акридин оранж на туморни клетки МСF7 клетки, нетретиранни (А) и третирани за 24 ч с екстракт от *Cotinus coggygia* (40.6 $\mu\text{g/ml}$) (Б) за визуализация на вътреклетъчни автофаголизозоми.

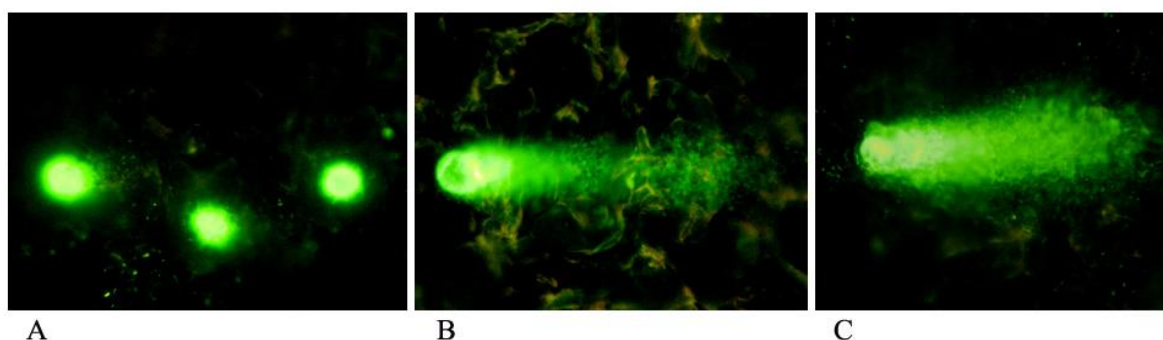
4.2.1.2. Генотоксичен ефект

С цел оценка на генотоксичния потенциал на тотален екстракт от *C. coggygia* в туморни клетки МСF7 беше проведен алкален вариант на кометен анализ. Методът представлява чувствителен подход за установяване честотата на едно- и двойноверижни скъсвания в ДНК на ниво единична клетка, чрез измерване на процента ДНК, мигрирала от главата на кометата (количеството нефрагментиран генетичен материал в ядрото) в областта на опашката (количеството фрагментиран генетичен материал).

При този анализ туморните клетки бяха третирани за 24 ч с различни концентрации на тоталния екстракт от *C. coggygia* (20, 40.6 и 100 µg/ml), като за отрицателна контрола бяха използвани нетретирани клетки, а като положителна контрола - клетки, третирани с блеомицин в концентрация 1.5 µg/ml за 1 час. Установено беше статистически значимо повишение на процента на ДНК, мигрирала в областта на опашките на кометите при третиране с IC₅₀ концентрацията на растителния екстракт за 24 ч (51.09 %), като получените стойности се доближаваха до тези, установени след третиране на клетките с положителната контрола блеомицин - 57.50% (Табл. 2, Фиг. 18). Интересно е да се отбележи, че след излагане на клетките на действието на екстракта в концентрация от 100 µg/ml, процентът на ДНК в опашката значително намалява в сравнение с този при по-ниските приложени концентрации, т.е. генотоксичният ефект на екстракта не показва дозова зависимост и по-ниските дози показват по-висока ефективност.

Таблица 2. Процент на ДНК в опашката, измерен чрез алкален вариант на кометен анализ след третиране на MCF7 клетки с различни концентрации на екстракт от *Cotinus coggygia*; * обозначава статистически значими разлики от контролната група (* $p < 0.05$).

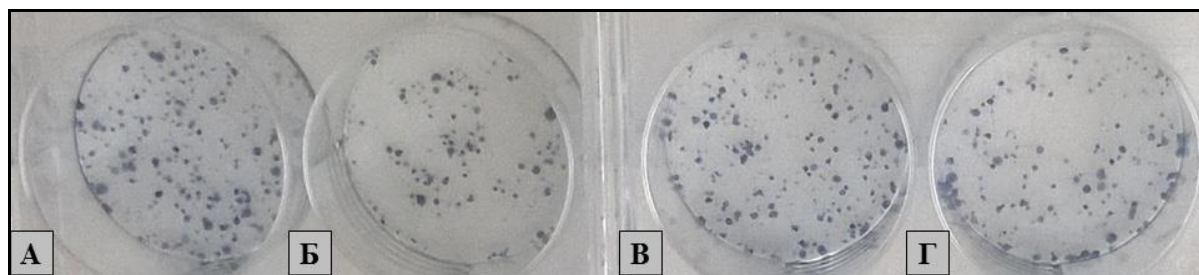
Третиране	Средна стойност на % ДНК в опашката ± SEM
Отрицателна контрола	17.41 ± 3.99
Екстракт от <i>C. coggygia</i> - 20 µg/ml (24 ч)	37.46 ± 4.83
Екстракт от <i>C. coggygia</i> - 40.6 µg/ml (24 ч)	51.09 ± 9.92 *
Екстракт от <i>C. coggygia</i> - 100 µg/ml (24 ч)	22.57 ± 1.98
Блеомицин - 1.5 µg/ml (1 ч)	57.50 ± 7.38 *



Фигура 18. Алкален вариант на кометен анализ за оценка на генотоксичността на тотален екстракт от *C. coggygia* след третиране на MCF7 клетки: А - отрицателна контрола - нетретирани клетки; В - третирани туморни клетки с екстракт от *Cotinus coggygia* (40.6 µg/ml); С - положителна контрола - третирани туморни клетки с блеомицин (1.5 µg/ml).

4.2.1.3. Влияние върху способността на клетките да формират колонии

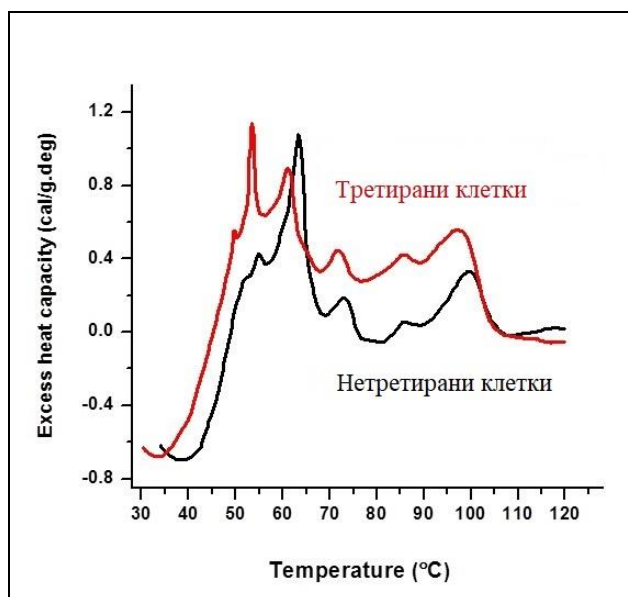
Като следваща стъпка при проучване механизмите на антитуморно действие на екстракта от лечебното растение *C. coggygia* беше проведен клоногенен анализ. Способността на MCF7 клетките да формират колонии след третиране с екстракта в концентрации 20, 40.6 и 55 $\mu\text{g/ml}$ беше отчетена след период от 11 дни. Наблюдавана беше съществена редукция в броя на колониите след третиране на туморните клетки с концентрация 20 $\mu\text{g/ml}$, съпоставени с контролни нетретирани клетки (Фиг. 19). Способността на раковите клетки да образуват колонии след третиране също не демонстрира дозова зависимост, тъй като при покачване на концентрацията на екстракта от 20 $\mu\text{g/ml}$ на 40.6 $\mu\text{g/ml}$ се проследяваше известно възстановяване на клоногенната способност на клетките, а при концентрация 55 $\mu\text{g/ml}$ отново се наблюдаваше слабо намаляване на броя на формираните колонии.



Фигура 19. Ефект върху способността за формиране на колонии на MCF7 клетки след третиране за период от 11 дни с екстракт от *C. coggygia* - 20 $\mu\text{g/ml}$ (Б), 40.6 $\mu\text{g/ml}$ (В) и 55 $\mu\text{g/ml}$ (Г), съпоставени с контрола от нетретирани клетки (А).

4.2.1.4. Ефект върху термодинамичното поведение на клетките

ДСК беше проведена след третиране на туморни клетки MCF7 с екстракт от смрадлика с концентрация IC_{50} (40.6 $\mu\text{g/ml}$). Установени бяха съществени различия в термограмите на нетретирани и третирани туморни MCF7 клетки (Фиг. 20). Различията са съсредоточени в нискотемпературната област, свързана с денатурирането на цитоплазмни и ядрени белтъци, както и РНК.



Фигура 20. ДСК термограми на MCF7 клетки, нетретираны и третираны с екстракт от *Cotinus coggygria* в концентрация 40.6 $\mu\text{g/ml}$ за 24 ч.

4.2.1.5. Модулиране на процеса на метилиране на ДНК

С цел да се задълбочат проучванията върху механизмите, посредством които екстрактът от лечебното растение смрадлика реализира антитуморното си действие, беше анализирана способността му да повлиява някои епигенетични процеси в туморната клетка, като метилирането на ДНК. Изследванията бяха насочени към оценка на относителните нива на експресия на 8 подбрани гена, кодиращи ключови ензими, ангажирани в процеса на ДНК метилиране (*DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b*, *MeCP2*, *MBD1*, *MBD2*, *MBD3* и *MBD4*), след третиране на туморни клетки MCF7 и контролни нетуморогенни клетки MCF10A с екстракта (концентрация 40.6 $\mu\text{g/ml}$) за различни времеви интервали (3, 24, 48, 72 часа), чрез количествена полимеразна верижна реакция след обратна транскрипция (qRT-PCR). Като контроли на всеки часов интервал бяха използвани нетретираны клетки. На анализ беше подложена експресията и на референтните гени актин (β -actin), алдолаза (*Ald*), и глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа (*GAPDH*), използвани като ендеогенни контроли.

Като първоначална стъпка беше направена предварителна оптимизация на условията за амплификация на изследваните гени чрез стандартен PCR, при която като матрица беше използвана кДНК.

При количествения qRT-PCR анализ на нивата на генна експресия беше отчетена експресията на референтните гени *Ald*, β -Actin и *GAPDH*, като за нормализация при

клетъчна линия MCF7 беше използван *β-Actin 1*, а за линия MCF10A - *Ald*, тъй като тези референтни гени показаха най-стабилна експресия при съответните линии.

Проведеният транскрипционен анализ на гените, участващи в процеса на метилиране на ДНК, показва тенденция за повлияване на експресията на три гена - *DNMT1*, *DNMT3a* и *MBD3* в туморните клетки MCF7.

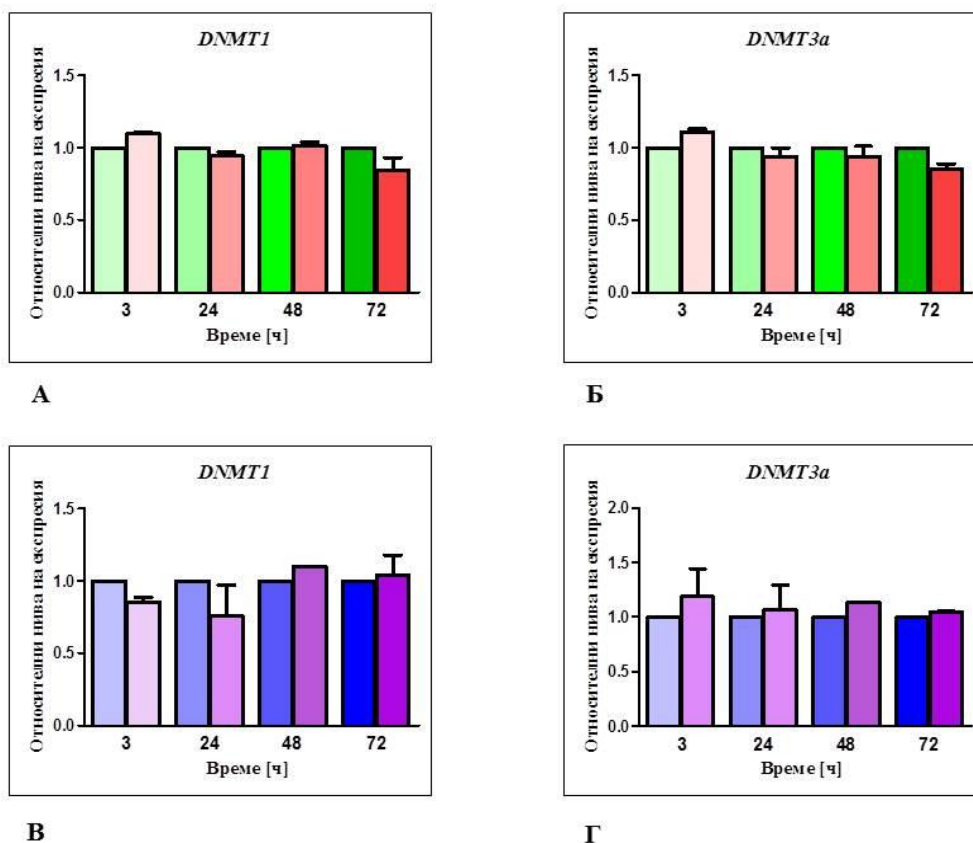
Относно гените, кодиращи ДНК метилтрансферазните ензими след третиране на туморните клетки с екстракта qRT-PCR анализът установи, че на 72-рия час от третирането се наблюдава тенденция за понижаване в нивото на експресия на *DNMT1* и *DNMT3a* в сравнение с нетретираната контрола (Фиг. 21А и Б).

По отношение на анализа на контролната клетъчна линия MCF10A, получените резултати демонстрираха понижаване в експресията на *DNMT1* след третиране на клетките с екстракта за 3 и 24 часа, докато на 48 и 72 ч беше установено слабо повишение в генната експресия, спрямо съответната контрола (Фиг. 21В). При *DNMT3a* беше наблюдавано повишение на транскрипционните нива във всички проследени времеви интервали в сравнение със съответните нетретиранни контроли (Фиг. 21Г).

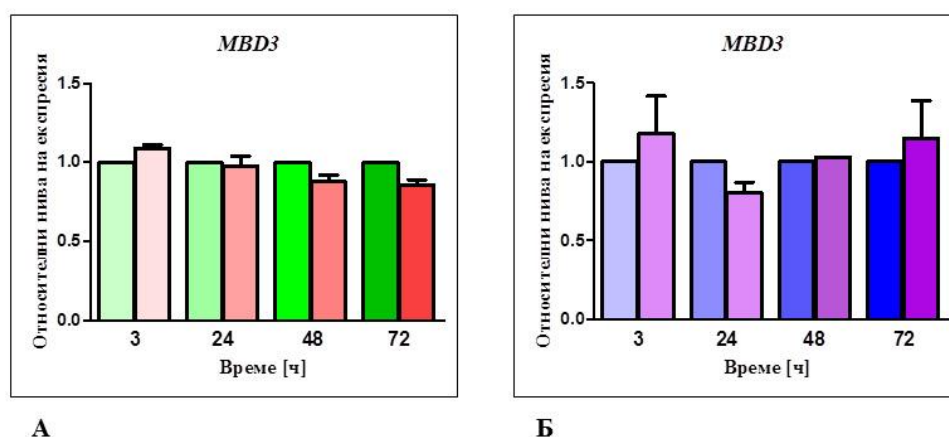
От анализирания с qRT-PCR пет гена, кодиращи ензими, представители на семейството на метил-СpG-свързващите белтъци (*MBD1*, *MBD2*, *MBD3*, *MBD4* и *MeCP2*), единствено при *MBD3* беше отчетена тенденция на изменение в количеството на мРНК при туморната клетъчна линия MCF7 (Фиг. 22А). На 72 ч от третирането с растителния екстракт, експресията на *MBD3* беше понижена в най-голяма степен.

При контролната клетъчна линия MCF10A на 3-тия и 72-рия час от експеримента беше наблюдавана тенденция за повишаване на транскрипционните нива на гена, а на 24-тия час – понижаване (Фиг. 22Б).

При нито един от изследваните гени, свързани с процеса на ДНК метилиране, не беше установена статистически значима разлика в нивото на експресия в сравнение с контролните нетретиранни клетки в същата времева точка.



Фигура 21. Относителни нива на експресия на DNMT1 и DNMT3a на 3, 24, 48 и 72 ч след третиране с екстракт от *C. coggyria*: А и Б - MCF7 клетки - зеленият цвят на колоните съответства на нетретиранни клетки, а червеният - на третирани клетки; В и Г - MCF10A клетки - синият цвят на колоните съответства на нетретиранни клетки, а лилавият - на третирани клетки. Показани са съответните стойности на SEM.

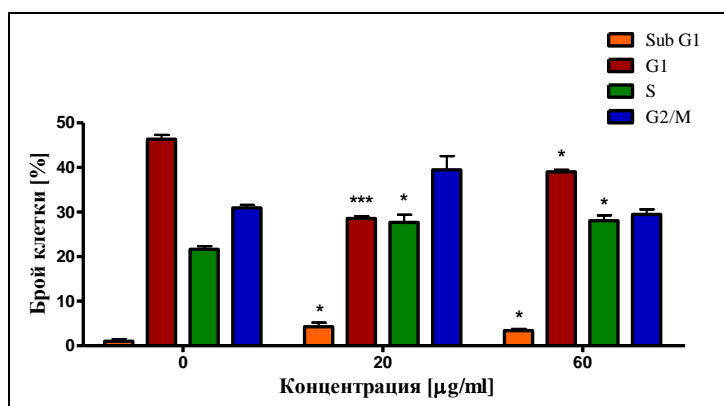


Фигура 22. Относителни нива на експресия на MBD3 на 3, 24, 48 и 72 ч след третиране с екстракт от *C. coggyria*: А - MCF7 клетки - зеленият цвят на колоните съответства на нетретиранни клетки, а червеният - на третирани клетки; Б - MCF10A клетки - синият цвят на колоните съответства на нетретиранни клетки, а лилавият - на третирани клетки. Показани са съответните стойности на SEM.

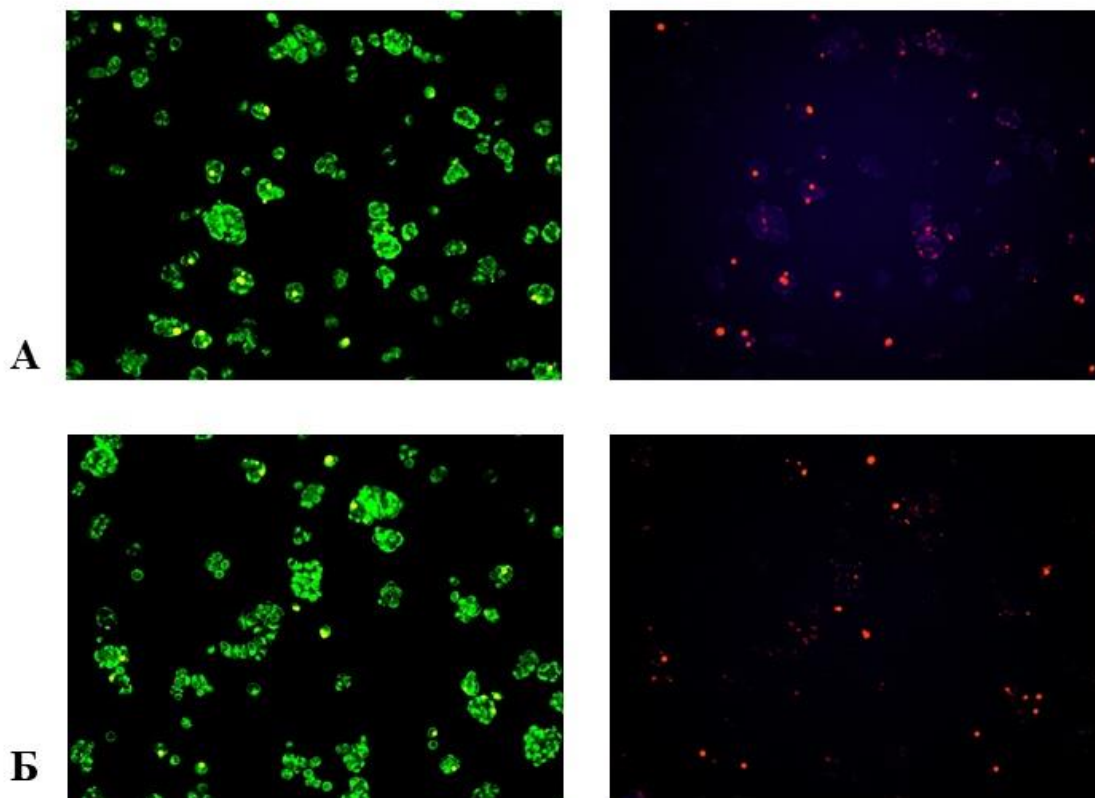
4.2.2. Механизми на антитуморно действие на хлороформна фракция на екстракт от *Tanacetum vulgare*

Проведени бяха някои първоначални изследвания върху механизмите на повлияване на баланса клетъчна пролиферация/клетъчна смърт под действие на хлороформната фракция на *T. vulgare*, включващи флоуцитометричен и флуоресцентно микроскопски анализ.

Ефектът на хлороформната фракция на *T. vulgare* върху прогресията на клетъчния цикъл беше изследван посредством характеризирани на съдържанието на ДНК в клетъчна линия MCF7. Туморните клетки бяха третирани с изследваната фракция в концентрации 20 и 60 $\mu\text{g/ml}$ за 24 ч и различните клетъчни популации (суб-G1, G1, S, G2/M) бяха изследвани чрез флоуцитометричен анализ. След третирането на клетките с двете концентрации на фракцията, беше установено, че броят на клетките в суб-G1 фазата, която е показателна за наличие на апоптоза, нараства статистически значимо ($p < 0.05$) в сравнение с нетретираната контрола (Фиг. 23). Наблюдавано беше и статистическо значимо спрямо нетретираните контроли нарастване ($p < 0.05$) в съотношението на раковите клетки в S-фазата и при двете приложени концентрации, придружено със значимо понижаване на броя на клетките в G1-фазата ($p < 0.001$ за 20 $\mu\text{g/ml}$; $p < 0.05$ за 60 $\mu\text{g/ml}$). При третиране с по-ниската концентрация беше проследено и повишаване на броя на клетките в G2/M-фазата в сравнение с контролните клетки, но без статистическа значимост. Получените от флоуцитометричния анализ резултати насочват, че механизмите на антитуморно действие на хлороформната фракция включват блокиране на клетъчния цикъл в S-фазата и индуциране на апоптоза.



Фигура 23. Флоуцитометричен анализ след белязане с пропидиев йодид на ефекта на хлороформна фракция на екстракт от *T. vulgare* върху разпределението на фазите на клетъчния цикъл на MCF7 клетки, третирани за 24 ч с концентрации 20 $\mu\text{g/ml}$ и 60 $\mu\text{g/ml}$. Показани са съответните стандартни грешки на средната стойност. * и *** обозначават статистически значими разлики от контролата (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).



Фигура 24. Флуоресцентно микроскопски анализ след беляване с акридин оранж на туморни клетки MCF7 клетки, нетретирани (А) и третирани за 24 ч с хлороформна фракция на екстракт от *T. vulgare* (27.98 $\mu\text{g/ml}$) (Б) за визуализация на вътреклетъчни автофаголизозоми.

С цел да се проучи способността на хлороформната фракция от вратига да индуцира процеса автофагия в MCF7 клетките беше проведен флуоресцентно микроскопски анализ след третиране за 24 ч в концентрация, съответстваща на IC_{50} (27.98 $\mu\text{g/ml}$). При анализа не беше наблюдавано съществено изменение на третираните спрямо контролни нетретирани клетки (Фиг. 24), което предполага, че в механизмите на анти туморната активност на хлороформната фракция на *T. vulgare* не участва процесът на автофагия.

5. ОБСЪЖДАНЕ

Независимо от напредъка в съвременната химиотерапевтична практика през последните десетилетия, конвенционалната онкотерапия не достига задоволителен резултат. Търсенето на перспективни кандидати за разработване на нови по-ефективни онкотерапевтични препарати сред медицински растения, показващи ценни биологични свойства, които се използват в традиционната фитотерапия, е силно застъпена тенденция в световен мащаб. Необходимостта от задълбочено проучване и характеризиране на свойствата, терапевтичния потенциал и точните механизми на действие на лечебните растения е от изключително значение, за да бъдат избегнати негативни ефекти, свързани с неправилната им употреба.

Докато някои изследвания се фокусират върху използването на единични пречистени активни вещества за разработването на нови онкотерапевтични препарати с растителен произход, то други акцентират върху екстракти/фракции от едно лечебно растение или от комбинация от растения. Основанието за прилагане на тотални растителни екстракти или комбинация от различни фитохимични съединения като средства за терапия на злокачествените заболявания се базира, от една страна, на синергичния ефект на различните вторични метаболити, присъстващи в екстракта, а от друга - на множеството таргети, върху които могат да окажат влияние екстрактите (Neergheen et al., 2009). Проучванията, разработени в настоящия дисертационен труд, се базират на втория подход.

Фитохимичният състав на представители на един и същ вид може да варира значително в зависимост от условията на специфичното местообитание, като различният химичен състав на растенията обуславя и разлики в биологичните им активности, степента и механизма на действието им. Позовавайки се на данните за огромното многообразие от ценни биологични активности на трите лечебни растения от България, изследвани в настоящия дисертационен труд: *Cotinus coggygria* (смардлика), *Tanacetum vulgare* (вратига) и *Cichorium intybus* (цикория), тези растителни видове бяха подбрани като обещаващ обект за по-задълбочени проучвания, касаещи техния потенциален анитуморен капацитет. Крайната цел на подобни изследвания, свързани със скринирането на растителните видове от различни географски популации, е тяхното евентуално приложение при разработването на фармакологични продукти с противотуморна насоченост. Съществуват литературни

данни за проучвания на *in vitro* антитуморните свойства на разглежданите растения при моделни системи от някои туморни клетъчни линии и единични *in vivo* изследвания за някои от тях при опитни животни, и въпреки че през последните една-две години интересът към тях се увеличава, антинеопластичният капацитет на екстракти и фракции от трите растения все още не е достатъчно добре проучен, а наличната информация за механизмите на действието им е оскъдна. Изследвания, касаещи антитуморните свойства на трите растения от българска популация, напълно липсват.

5.1. Оценка на антитуморния потенциал на *Cotinus coggygria*

Смрадликата е едно от най-популярните лечебни растения в България, намиращо широко приложение, както в етномедицинските практики, така и в препарати, използвани в конвенционалната медицина и козметика. Ценните му качества по отношение на различни медицински активности, го превръщат в обект на интензивни проучвания във връзка, както с химичния му състав, така и с биологичните му свойства. Данни за антитуморна активност на българската билка до този момент не са съобщавани от други автори.

При проведения анализ за оценка на цитотоксичния ефект на тотален водно-етанолов екстракт от листен материал на *C. coggygria* върху туморна клетъчна линия MCF7 от аденокарцином на млечната жлеза, беше установена значителна редукция на преживяемостта на клетките със стойност на IC_{50} концентрацията от 40.6 $\mu\text{g/ml}$. Наблюдаваният цитотоксичен ефект на екстракта не показва концентрационна- и времева зависимост.

В световен мащаб литературните данни за цитотоксични свойства на екстракти от смрадлика са ограничени. Установената в настоящото изследване стойност на IC_{50} за тоталния листен екстракт от растението от България по отношение на преживяемостта на MCF7 клетките е по-висока, когато се съпостави с тази, получена при изследване на *Savikin* и *съавт.* (2009) на метанолови екстракти от листа и цветове от растението от Сърбия върху HeLa клетки (IC_{50} 9.01 $\mu\text{g/ml}$ и 29.4 $\mu\text{g/ml}$, респективно), но спрямо клетъчна линия от рак на дебелото черво LS174 (65.4 $\mu\text{g/ml}$ и 41.3 $\mu\text{g/ml}$, съответно) българско растение демонстрира по-ниска стойност на IC_{50} . Различните стойности на IC_{50} концентрациите се обуславят от една страна от вероятните различия във фитохимичния състав на проучваните екстракти от растителни популации от различни

местообитания, а от друга страна - от различната чувствителност към действието на екстракта, която проявяват използваните моделни клетъчни линии.

Друго изследване разкрива, че метанолов екстракт от надземни части на *S. coggugria* от растителна популация от Италия проявява цитотоксична активност спрямо клетъчни линии от рак на белия дроб (A549) и млечната жлеза (MCF7) (Pollio et al, 2016). По отношение на MCF7 клетките, клетъчната преживяемост се понижава дозозависимо. Установено е, че при по-ниски концентрации, цитотоксичният ефект е обратим, докато при по-високи действието му е необратимо.

Изследваният от нас тотален екстракт от смрадлика демонстрира наличие на инхибиторен ефект върху пролиферацията на клетъчните линии A2780, MCF7, T47D и HeLa. Налична информация в литературата относно антипролиферативен капацитет на екстракти от смрадлика, е открита за метанолов екстракт от листа на растението от Турция по отношение на туморна клетъчна линия HeLa, като е установена стойност на IC₅₀ от 293 µg/ml и значително по-слаб ефект върху нормалната линия Vero в сравнение с раковата (Artun et al., 2016). Антипролиферативният потенциал на проучвания от нас екстракт е значително по-висок по отношение на клетъчна линия HeLa, като се съди по значително по-ниската стойност на IC₅₀ (122.7 µg/ml).

Сред четирите ракови клетъчни линии, подложени на въздействие на екстракта от *S. coggugria* в проучванията от дисертационния труд, с най-висока чувствителност спрямо действието му се характеризира линия A2780 (IC₅₀ - 30.77 µg/ml), следвана от MCF7 (55.02 µg/ml), а най-устойчиви се оказват HeLa клетките. Единствено при клетъчната линия от рак на маточната шийка беше наблюдавана концентрационна зависимост в ефекта, докато при останалите три линии такава не беше установена – при най-високите прилагани концентрации се проследяваше слабо понижение на инхибиторния ефект на екстракта в сравнение с ефекта на дозите от междинния диапазон. Подобно явление за липса на строга дозова зависимост и понижаване на антитуморните активности на различни субстанции при високи дози на прилагане не е необичайно и се наблюдава и при други растителни екстракти и химиотерапевтични агенти. Пример в това отношение са химиотерапевтици, спадащи към класа на антиметаболитите. За този клас съединения е характерно, че действието им показва специфичност по отношение на фазата на клетъчния цикъл на туморните клетки, като най-силна активност притежават през S-фазата. При тях не се наблюдава линейна

зависимост на отговора с увеличаване на дозата и след достигане на определена концентрация цитотоксичният ефект не се повишава повече, независимо от нарастването на прилаганите дози, а навлиза в плато (*Malhotra and Perry, 2003*). Възможна причина за липсата на концентрационна зависимост по отношение на антитуморната активност на растителните екстракти би могло да бъде изчерпването на специфичните таргети на действие.

Има данни, че върху три от туморните клетъчни линии, които използваме като моделна система в настоящото изследване, а именно A2780, MCF7 и HeLa, както и върху клетъчна линия от РМЖ MDA-MB-231, е проучен антипролиферативния ефект на разтворима в диетилов етер фракция на метанолов екстракт от дървесина на смрадлика от Румъния (*Antal et al., 2016*). Въпреки че тези анализи засягат фракция, а не тотален екстракт от растението, те корелират до известна степен с получените от нас резултати, тъй като най-силни цитостатични свойства са регистрирани върху клетъчната линия A2780 - клетъчният растеж се редуцира до 50% при концентрация 16 $\mu\text{g/ml}$. По-слаб ефект е наблюдаван при останалите изследвани клетъчни линии.

По наше знание, до момента в наличната литература в световен мащаб липсва информация за изследване на антитуморните свойства на екстракти или фракции от смрадлика спрямо клетъчна линия T47D от рак на млечната жлеза и настоящата дисертационна разработка включва първото изследване в този аспект. Установената за тази линия IC_{50} концентрация възлиза на 61.08 $\mu\text{g/ml}$, което ѝ отрежда междинна позиция по отношение на чувствителността към действието на екстракта в сравнение с другите анализирани туморни клетъчни линии.

Сред активните съставки на смрадликата антинеопластични свойства са открити за галовата киселина (*Sohi et al., 2003*), за тотална флавоноидна фракция от растението (*Wang et al., 2015*), както и за единични представители на този клас съединения, като апигенин, мирицетин, кверцетин, сулфуретин, фустин (*Maurya et al., 2011; Ruela-de-Sousa et al., 2010; Zhang et al., 2010; Duo et al., 2012; Antal et al., 2016*).

Установеният значително по-слаб инхибиторен ефект върху преживяемостта и пролиферацията на MCF10A клетките е показател за селективност в действието на екстракта. По отношение на селективността на *S. cogygia*, изследвания на *Павлов (2015)*, свързани с оценка на цитотоксичния потенциал на растението от българска популация върху нормални клетки, показват, че водно-етанолови екстракти от листа и

дървесина не проявяват цитотоксичност към миши клетъчни култури от преадипоцити (3T3-L1) и макрофаги (J774A.1) при прилагане в определени концентрационни интервали. За екстракта от листа на смрадлика е установен стимулиращ ефект върху клетъчната пролиферация на 3T3-L1 преадипоцитите при третиране с концентрации 2.5-15%. Екстрактът от дървесина не проявява цитотоксичност спрямо преадипоцити при концентрации 0.15-2.5%. С нарастване на концентрациите обаче преживяемостта на клетките намалява, но не достига по-ниски стойности спрямо използваната контрола, третирана с 40% етанол. По отношение на клетъчната линия от макрофаги, екстрактът от дървесина на смрадлика показва стимулиращ ефект при по-ниските процентни участия на екстракта в хранителната среда – до 1.25%, а с нарастване на концентрацията преживяемостта на клетките плавно намалява, но остава по-висока от преживяемостта при контролата, третирана с 40% етанол. Като възможно обяснение на стимулиращия ефект, който оказва екстрактът от листа върху преадипоцитната клетъчна линия, се посочва способността на някои фенолни съединения да активират MAP сигналните каскади (Kong *et al.*, 2000). Друга вероятна причина е комбинацията от компонентите в тоталния екстракт да има различен ефект от този на чистите активни съставки.

Друго проучване разкрива, че етанолов и воден екстракт от растението от италианска популация инхибират преживяемостта на две човешки нормални клетъчни линии от гингивални фибробласти (HGF-1) и кератиноцити (HaCaT), като инхибиторният ефект на етаноловия екстракт е по-силен (Ferrazzano *et al.*, 2013). Използваната в изследването концентрация се равнява на 5 mg/ml, доза многократно по-висока от тези, използвани в настоящото проучване.

Основни механизми за реализиране на противотуморен ефект на растителните продукти са потискане на клетъчната пролиферация, посредством задържане на клетъчния цикъл в някоя от фазите му, и инициране на процес на програмирана клетъчна смърт. Апоптозата е форма на програмирана клетъчна смърт, която включва множество биохимични процеси и необратими морфологични промени в клетката, несъвместими с нейното нормално функциониране. Процесът се задейства в отговор на повреди в ДНК, като механизъм, предпазващ увредената клетка от трансформация. Устойчивостта на раковата клетка към апоптоза е събитие, тясно свързано с

туморогенезата. Възстановяване на протичането на този процес в раковата клетка е прицелен механизъм за антитуморните агенти (*Joshi et al., 1999*).

В настоящото проучване на анализ беше подложена способността на екстракта от *C. coggygia* да повлиява баланса между процесите на клетъчния цикъл и клетъчната смърт в линии A2780 и MCF7, посредством метода флоуцитометрия. Тъй като съдържанието на клетъчната ДНК се променя закономерно по време на различните фази при прогресията на клетъчния цикъл, определянето на точното разпределение на клетъчната популация във всяка от фазите се осъществява чрез свързване с ДНК на специфично флуоресцентно багрило. Данните от проведения анализ след третиране на туморната линия A2780 за 72 часа с екстракта в концентрация 40 µg/ml установиха статистически значимо повишаване на броя на клетките в суб-G1 клетъчната популация, което беше показател за наличие на проапоптотична активност на екстракта.

По отношение на ефекта на екстракта върху разпределението на MCF7 клетките във фазите на клетъчния цикъл след третиране бяха установени статистически значими разлики спрямо нетретирани контролни MCF7 клетки при всички приложени концентрации. Броят на клетките, навлезли в апоптоза, след третиране с концентрации 40 µg/ml и 60 µg/ml беше повишен със статистическа значимост в сравнение с нетретирани клетки. При концентрации 30, 40 и 60 µg/ml, значителното нарастване на броя на клетките в S-фазата е индикация за блокиране на клетъчния цикъл и невъзможност на пролиферативния процес да прогресира.

Изследване на *Pollio и съавт. (2016)* разкрива, че етанолов екстракт от надземни части на *C. coggygia* от Италия блокира клетъчния цикъл в G1-фазата в клетъчни линии A549 (рак на белия дроб), MCF7, U937 (хистоцитен лимфом) и ТК6 (В-лимфобластoid) след 24 часов период на третиране. Важно е да се отбележи, че екстрактът предизвиква кохерентни ефекти върху клетъчния цикъл и на четирите изследвани клетъчни линии, независимо от различния им фенотип, тъй като A549 и MCF7 клетките са с епителен произход и са адхерентни, а U937 и ТК6 са лимфобластoidни клетки, растящи в суспензия.

От активните съставки, влизащи в състава на растението, за апигенина е известно, че антитуморната му активност е свързана със способността му да опосредства блокиране на клетъчния цикъл и индукция на апоптоза посредством p53-зависими пътища (*Sung et al., 2016*), както и че действието му води до инхибиране на

Е2-индуцираната ДНК синтеза и пролиферацията на естроген рецептор (ER)-положителни и ER-отрицателни туморни клетки от РМЖ (Yin *et al.*, 2001). Освен чрез апотоза, апигенинът може да индуцира клетъчна смърт и чрез процеса автофагия.

Установено е, че редица онкотерапевтични агенти, които се прилагат като част от конвенционалната или от таргетната терапия, като иматиниб, цетуксимаб, вориностат, тамоксифен и др., индуцират автофагия в туморните клетки. Връзката на процеса на автофагия с малигнените заболявания е комплексна. Докато едни изследвания насочват, че този тип програмирана клетъчна смърт може да наруши туморната прогресия в ранните ѝ етапи, то според други, високите нива на автофагия при много различни видове онкологични заболявания е индикация, че процесът подпомага прогресията на установени неоплазии (Lorin *et al.*, 2013; Rao *et al.*, 2014). В последните години е установявано, че по отношение на онкологичните заболявания, автофагията може да бъде неутрален, туморно супресорен или туморно промотиращ процес, като някои изследвания доказват, че ролята му преимуществено е туморно супресорна (Karantzis-Wadsworth and White, 2007).

Във връзка с гореизложеното, в настоящото проучване подложихме на анализ способността на тоталния екстракт от смрадлика да насочва туморните клетки MCF7 към процес на автофагия. При проведените експерименти беше установена тенденция за повишаване броя на клетките, при които е индуциран този процес. До този момент в литературата липсват данни за оценка на способността на лечебното растение *S. coggygia* да индуцира процес на автофагия в туморни клетки.

Като информативен метод, илюстриращ потенциала на различни агенти да повлияват способността на туморните клетки да образуват колонии, клоногенният анализ беше приложен след третиране на MCF7 клетките с екстракта от *S. coggygia*. При най-ниската използвана концентрация, екстрактът понижава значително клоногенността на клетките, но с нарастване на прилаганите концентрации този ефект не следваше дозова зависимост.

Липса на концентрационна зависимост във въздействието на екстракта от смрадлика по отношение на MCF7 клетките беше наблюдавано и при анализ на генотоксичния му потенциал. Оценката на генотоксичния потенциал на растителните екстракти, или способността им да индуцират възникване на първични повреди в ДНК молекулата на туморната клетка, е от съществено значение за изясняване на точните механизми, на които се базира антитуморното им действие. Честотата на едно- и

двойноверижните скъсвания в ДНК оказват съществено влияние върху геномната стабилност, прогресията на клетъчния цикъл и развитието.

Генотоксичният капацитет на изследвания от нас тотален екстракт от *C. coggygia* в туморните клетки от рак на млечната жлеза РМЖ беше изследван посредством алкален вариант на кометен анализ. Получените резултати показаха значителен генотоксичен ефект на растителния екстракт след третирането на клетките с концентрация 40.6 µg/ml, като стойностите на процента ДНК, мигрирала от главата на кометата в опашката, наблюдавани при тази концентрация, бяха много близки до тези след третиране на клетките с положителната контрола блеомицин. В литературата липсват данни за проучване на генотоксичния потенциал на *C. coggygia* върху туморни клетъчни линии и това е първото изследване в този аспект.

Диференциалната сканираща калориметрия е подходящ метод за оценка на онкотерапевтичния ефект на лекарствени агенти, посредством биофизично характеризирани на термодинамичното поведение на туморни клетки след третиране. При проведените експерименти беше установено, че след третиране на туморни MCF7 клетки с тотален екстракт от *C. coggygia* възникват съществени различия в клетъчните калориметрични профили в сравнение с нетретирани клетки. Наблюдаваните различия са асоциирани с денатурирането на белтъци и РНК в третираните клетки.

В човешките туморни клетки се наблюдава глобално хипометилиране на ДНК, което може да доведе до геномна нестабилност, както и хиперметилиране в промоторната област на специфични туморно супресорни гени, свързано със загуба на туморно супресорната функция. В онкологичната практика са въведени някои синтетични ДНК метилтрансферазни инхибитори, като прокаин, азацидин, децитабин, които обаче причиняват сериозни странични ефекти и проявяват висока химична нестабилност. През последните години нараства обемът на получената информация за различни лечебни растения и изолирани активни съставки, способни да променят експресията на специфични гени, чрез модулиране на епигенетичните процеси при различни злокачествени заболявания (*Shukla et al., 2014*). Сред фитохимичните съединения, способни да понижават експресионните нива на ДНК метилтрансферазни белтъци, са ресвератрол, кверцетин, генистеин, EGCG (*Thakur et al., 2014*) и др.

В тази връзка, една от задачите в нашите изследвания беше да се подложи на анализ способността на екстракта от *C. coggygia* да оказва влияние върху процеса на ДНК метилиране, посредством оценка на експресионните нива на подбрани гени чрез

qRT-PCR. След третиране на туморни (MCF7) и нетуморогенни (MCF10A) клетки беше установена тенденция за понижаване на експресията на гените *DNMT1*, *DNMT3a* и *MBD3* в туморните клетки в сравнение с нетретираната контрола. Тази тенденция беше наблюдавана на 72-рия час след излагането на клетките на действието на екстракта, като статистическа значимост не беше установена.

Ензимът DNMT1 е от съществено значение за поддържане на нормалния профил на метилиране в клетките, докато DNMT3a притежава *de novo* метилтрансферазна активност. MBD3 принадлежи към семейство ядрени белтъци, характеризиращи се с присъствие на метил-СрG-свързващ домен. Представява субединица на NuRD-комплекса, който притежава ремоделираща нуклеозомите и хистон деацетилазна активност.

Настоящото изследване е първото, по наше знание, проучващо способността на екстракт от лечебното растение *Cotinus coggygia* да повлиява някои епигенетични процеси в туморни клетки, като по този начин да регулира експресията на ключови гени, участващи в процеса на канцерогенеза.

5.2. Оценка на антитуморния потенциал на *Tanacetum vulgare*

Вратигата е лечебно растение с множество приложения в традиционната фитотерапия и част от състава на редица медицински препарати, насочени срещу различни заболявания. От съществено значение е да се отбележи, че растението не бива да се използва за самолечение и трябва се прилага само по лекарско предписание, тъй като е токсично и е възможно отравяне дори при прилагане на малки дози. По отношение на *T. vulgare* от българска растителна популация са проведени значителен брой изследвания във връзка с многообразието на фитохимичния му състав, но до този момент не са описани данни за антинеопластичните му свойства.

Изследванията на цитотоксичния капацитет на тотален водно-етанолов екстракт от надземни части на *T. vulgare* спрямо клетъчна линия MCF7 установиха наличие на статистически значима концентрационна- и времева зависимост на инхибиторно действие на екстракта върху преживяемостта на туморните клетки, като IC₅₀ концентрацията възлизаше на 286.8 µg/ml.

До настоящия момент, данните относно цитотоксичните свойства на екстракти от вратига са сведени до няколко *in vitro* проучвания. *Wegiera и съавт. (2012)* съобщават, че етанолови екстракти от надземни части, корени и цветове на растението,

събрано от естествен хабитат в Полша, имат инхибиторен ефект върху клетъчна линия от остра Т-клетъчна левкемия (J-45.01) със стойности на IC₅₀: 360 µg/ml (надземни части), 200 µg/ml (цветове) и 300 µg/ml (корени), които са съпоставими с установената в настоящия научен труд IC₅₀ концентрация на тоталния екстракт спрямо линия MCF7. Значително по-силен цитотоксичен ефект демонстрира хлороформен екстракт от надземни части на вратига от растителна популация от Канада върху клетъчни линии от рак на дебелото черво (WiDr), млечната жлеза (MDA-MB-231) и белия дроб (NCI-417), като стойностите на IC₅₀ варират от 2.4 до 9.1 µg/ml (*Ramírez-Erosa et al., 2007*). *Liu and Jiang (2017)* съобщават, че воден екстракт от листа на *T. vulgare* от Китай проявява инхибиторен ефект върху преживяемостта на MCF7 клетки, без да показва дозова зависимост, и редуцира клетъчната преживяемост с повече от 50% при концентрация 20 µg/ml, което показва по-силни цитотоксични свойства в сравнение с проучвания от нас екстракт.

Получените от нас резултати относно антипролиферативните свойства на екстракта не показаха понижение на пролиферативната способност на четирите анализирани туморни клетъчни линии (HeLa, MCF7, T47D и A2780) до 50% при прилагане на дози до 180 µg/ml. В най-значителна степен се редуцира пролиферацията при линия от рак на млечната жлеза T47D. При съпоставяне на нашите резултати с данните от наличната литература по отношение на антипролиферативния капацитет на екстракти от растението установихме, че той е бил обект само на едно проучване, което съобщава за значително по-силно инхибиторно действие на метанолов и метиленхлориден екстракти от надземни части на *T. vulgare* от Русия върху растежа на миша клетъчна линия от левкемия L1210 (*Goun et al., 2002*). Данни за проучвания в световен мащаб на цитостатичните свойства на екстракти от растението върху човешки туморни клетъчни линии не бяха открити. Проведените от нас анализи представляват първите в тази посока.

След подлагане на процес на фракциониране на тоталния водно-етанолов екстракт от надземни части на българското лечебно растение *T. vulgare* до водно-метанолова и хлороформна фракции, беше отчетен значително по-силен инхибиторен ефект на хлороформната фракция върху пролиферацията на туморни клетъчни линии HeLa, MCF7 и A2780 в сравнение с тоталния екстракт, докато водно-метаноловата фракция не показва наличие на антипролиферативни свойства. Инхибиторният ефект на

хлороформната фракция в най-голяма степен повлиява растежа на клетъчна линия MCF7 със стойност на IC_{50} от 27.98 $\mu\text{g/ml}$. По наше знание в литературата липсват други данни за проучвания на антитуморните свойства на фракции от екстракти на лечебното растение вратига, освен получените от нас. Значителният антитуморен потенциал, който демонстрира хлороформната фракция я определя като перспективен обект за следващи проучвания. По отношение на A2780 клетките, хлороформната фракция също показва значително инхибиторно действие (IC_{50} - 37.53 $\mu\text{g/ml}$), а клетъчната линия HeLa прояви най-висока устойчивост на действието на фракцията от трите изследвани линии.

За етерично масло от надземни части на вратига от растителна популация от Канада *Coté и съавт. (2017)* съобщават за наличие на умерен цитотоксичен ефект върху клетъчна линия от рак на дебелото черво (DLD-1) и слаба цитотоксична активност към нормална клетъчна линия от кожни фибробласти (WS1), а за компонентите на етеричното масло: α -хумулен, α -пинен, β -кариофилен, β -пинен, лимонен, кариофиленоксид, камфен е установена умерена цитотоксичност към клетъчни линии от рак на белия дроб (A549), дебелото черво (DLD-1), кератиноцити (HaCaT) и фибробласти (WS1). Други активни съставки на вратигата, за които е установена антитуморна активност, са сесквитерпените лактони: лудовицин А, лудовицин Б, доугланин, 1 α -Hydroxy-1-deoxoarglanine, 11,13-Dehydrosantonin (*Rosselli et al., 2012*), партенолид (*Woyanaroski and Konopa, 1981*), флавоноидите: еупаторин (*Androutsopoulos et al., 2008*), кверцетин и апигенин (*Ruela-de-Sousa et al., 2010; Zhao et al., 2011*).

Проведените в настоящата разработка изследвания, касаещи проучване на селективността на тоталния екстракт от вратига и хлороформната му фракция по отношение на нетуморогенната клетъчна линия MCF10A, демонстрират значително по-слабо понижение на клетъчната преживяемост (IC_{50} на тотален екстракт > 600 $\mu\text{g/ml}$) и пролиферация (IC_{50} на хлороформна фракция > 180 $\mu\text{g/ml}$) при нетуморогенните клетки в сравнение с туморните клетки. По отношение на други изследвания, проучващи ефектът на лечебното растение спрямо нормални клетки, *Alvarez и съавт. (2011)* установяват, че след третиране на клетъчна линия Vero с тотален метанолов екстракт от надземни части на *T. vulgare* от растителна популация от Великобритания и пет негови фракции (бутанолова, водна, етилацетатна, петролево-етерна, хлороформна), бутаноловата и водната фракции не оказват токсичен ефект върху Vero клетките,

докато след третиране с концентрации 250 µg/ml - за тотален екстракт, петролево-етерна и етилацетатна фракции, и 100 µg/ml за хлороформна фракция се наблюдава поява на морфологични изменения във Vero клетките. Установените при проучването на Alvarez и съавт. (2011) стойности за цитотоксична концентрация 50% на тоталния екстракт и хлороформната фракция са 515.2 µg/ml и 56.55 µg/ml, съответно.

Проучването на способността на хлороформната фракция да модулира прогресията на клетъчния цикъл и процесите на програмирана клетъчна смърт в MCF7 клетките, посредством провеждане на флоуцитометричен анализ за определяне на съдържанието на ДНК, установи процес на блокиране на клетъчния цикъл в S-фазата и индуциране на програмирана клетъчна смърт - апоптоза. Изследванията в световен мащаб относно механизмите на антитуморно действие на екстракти от *T. vulgare* се свеждат само до едно проучване, а относно фракции от растението напълно отсъстват. Публикация на Wegiera и съавт. (2012) докладва за наличие на проапоптотичен потенциал на етанолов екстракт от билката върху клетъчна линия от остра T-клетъчна левкемия, като е наблюдавано повече от 30 пъти нарастване на броя на клетките в апоптоза и некроза с повишаване на времето на третиране от 4 ч (2.7%) до 48 ч (82.5%). Наблюдаваното в нашето проучване повишаване на броя на клетките в апоптоза след третиране с две концентрации от хлороформната фракция на *T. vulgare* (20 и 60 µg/ml) е проследено за период от 24 часа и показва малко по-висока стойност за клетките, третирани с по-ниската концентрация от 20 µg/ml - 4.26% в сравнение с тези, третирани с концентрация 60 µg/ml - 3.41%, като при контролните нетретирани клетки стойността за апоптотичните клетки беше 1.03%.

Анализът на клетъчния цикъл показва статистическо значимо повишаване на процентното съотношение на клетките, намиращи се в S-фазата за клетъчния цикъл в сравнение с контролните нетретирани клетки, съпроводено с намаляване на броя на клетките в G1-фазата. Изследване на Androutsopoulos и съавт. (2008) върху прогресията на клетъчния цикъл в линия от рак на млечната жлеза MDA-MB-468 след третиране с флавоноида еупаторин, който влиза в състава на *T. vulgare*, разкрива, че съединението блокира клетъчния цикъл в G2/M-фазата без да повлиява клетъчния цикъл в MCF10A клетките. Друго проучване установява, че еупаторинът осъществява задържане в G2/M-фазата и индуцира апоптоза в клетъчна линия от левкемия чрез активиране на каспазите и освобождаване на цитохром c от митохондриите (Estévez et

al., 2014). За флавоноида кверцетин, който влиза в състава и на трите растения, обект на дисертационния труд, е известно че представлява инхибитор на PI3K пътя (Nguyen et al., 2004), проявява антипролиферативен ефект и индуцира апоптоза при MCF7 клетки (Duo et al., 2012), като се смята, че упражнява инхибиторен ефект върху ензими, участващи в контрола на клетъчния цикъл (Middleton Jr et al., 2000).

Хлороформната фракция на екстракт от *T. vulgare* беше подложена на следващи анализи във връзка с нейната способност да индуцира в туморните клетки процес на автофагия, като алтернативен на апоптозата тип на програмирана клетъчна смърт. При проведената флуоресцентна микроскопия след третиране на туморните клетки не беше наблюдавано увеличаване на количеството клетки, съдържащи киселинни вакуоли, които представляват характерен белег на автофагозомния процес, което предполага, че в механизмите на антитуморното действие на фракцията от вратига не участват процеси на автофагия. До този момент, по наше знание липсват данни за проучвания върху способността на лечебното растение вратига да индуцира процеса автофагия.

5.3. Оценка на антитуморния потенциал на *Cichorium intybus*

Cichorium intybus е лечебно растение, широко разпространено в страната ни и по света, което освен с многобройни приложения в хранително-вкусовата промишленост се характеризира и със значителен брой ценни биологични свойства и огромен терапевтичен потенциал. Интересът към него нараства в световен мащаб, но растението от българска популация не е напълно проучено и изследванията, както по отношение на фитохимичния му състав, така и във връзка с разнообразните му активности, са сравнително малко на брой (Nikolova et al. 2011; Denev et al., 2014; Dzharov et al., 2016), а относно противотуморните му възможности, напълно отсъстват.

Включените в настоящото проучване анализи за оценка на клетъчната преживяемост на MCF7 туморни клетки, след въздействие с тоталния водно-етанолов екстракт от надземни части на цикория, регистрират слабо повлияване на клетките от екстракта в ниските и средните концентрации и значително усилване на инхибиторния му ефект при по-високите прилагани дози. Установеният инхибиторен ефект не показва стабилна дозова зависимост. Изчислената стойност на IC₅₀ концентрацията е 428.9 µg/ml. Установена беше слаба времева зависимост по отношение на редуцирането на клетъчната преживяемост. При изследванията, касаещи MCF10A нетуморогенните

клетки, екстрактът демонстрира слаб инхибиторен ефект само при най-високата изследвана концентрация.

По отношение на силата на антитуморното действие спрямо туморните клетки MCF7, екстрактът от лечебното растение заема междинна позиция в сравнение с екстракти на представители на вида от други растителни популации. При изследвания на *Saleem и съавт. (2014)* с п-хексанов екстракт от надземни части на цикория от популация от Пакистан е установено, че при третиране на лимфобластни левкемични клетки (Jurkat) в концентрации от 10 до 100 µg/ml за период от 24 часа екстрактът редуцира значително броя на живите клетки до 50.3%. Друго проучване на воден екстракт от семена на цикория от популация от Индия върху преживяемостта на туморни клетъчни линии T47D, RKO (дебело черво) и PC-3 (простата) отчита умерено понижение след третиране за 24 ч с дози от 1 до 10% (за T47D в диапазона 2-21%; RKO - 6-26%; PC-3 - 2-30%) (*Nawab et al., 2011*), стойности, които индикират по-силен ефект на екстракта на растението от България. Проучване на *Abu-Dahab и Afifi (2007)* съобщава, че етанолов екстракт от надземни части на цикория от Йордания не само, че не понижава пролиферацията на MCF7 клетки след третиране за 72 ч с концентрация 50 µg/ml, а дори оказва слаб стимулиращ растежа на клетките ефект (105.15% клетъчна пролиферация). За сравнение можем да посочим, че след третиране за 24 часа със същата концентрация от 50 µg/ml, изследваният от нас екстракт показва стойност на клетъчната преживяемост на MCF7 клетките от 92.28%. Като се има предвид регистрираното в нашето изследване слабо времезависимо понижение на преживяемостта на екстракта при MCF7 клетките, може да се предполага, че след 72 часа третиране с 50 µg/ml антипролиферативният потенциал на нашето растение ще бъде по-висок от този, описан за *C. intybus* при анализа на *Abu-Dahab и Afifi*. При анализ на антитуморния потенциал на водно-етанолов екстракт от листен материал от *C. intybus* от растителна популация от Италия за 48 ч период на третиране с концентрация на екстракта от 100 µg/ml е установена стойност на инхибиторния ефект около 30% за човешка меланомна клетъчна линия (*Conforti et al., 2008*). При *in vivo* проучвания *Hazra и съавт. (2002)* получават данни, че тотален етанолов екстракт от корени на растението, приложен в концентрации от 300 до 700 mg/kg, инхибира в значителна степен карцином на Ерлих при мишки.

Антитуморни свойства са съобщени за активните съставки на растението магнолиалид, фруктани от инулинов тип и антоцианинът *trans-3-p-coumaroylquinic acid* (Pool-Zobel, 2005; Lee et al., 2000; Hsieh et al., 2010).

В заключение, получените в рамките на настоящия дисертационен труд резултати показват, че от трите растения, обект на анализ, най-силен антитуморен потенциал притежават *Cotinus coggygia* (тотален екстракт) и *Tanacetum vulgare* (хлороформна фракция). В механизмите на антитуморното действие на смрадликата вероятно взимат участие процеси, свързани с блокиране на клетъчния цикъл, индукция на апоптоза и автофагия, генотоксични ефекти, понижаване на клоногенната способност и тенденция към повлияване на процеса на ДНК метилиране. Хлороформната фракция от вратига осъществява антитуморното си действие като индуцира блокиране на клетъчния цикъл и апоптоза. Резултатите имат както научна, така и потенциална приложна стойност. В научен аспект, те ще обогатят наличните литературни данни за биологичните ефекти на екстракти и фракции от растенията и техните механизми. В приложен аспект, резултатите дават насока за задълбочаване на изследванията с оглед на използването на субстанциите при разработването на нови онкотерапевтични препарати на растителна основа.

6. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ

Въз основа на получените резултати могат да бъдат направени следните изводи:

1. Тотални водно-етанолови екстракти от *Cotinus coggygria*, *Tanacetum vulgare* и *Cichorium intybus* от българска растителна популация демонстрират в различна степен наличие на *in vitro* анти tumorни свойства и селективност по отношение на нетуморогенни клетки. Най-силно анти tumorно действие има екстрактът от *C. coggygria*, следван от *T. vulgare* и *C. intybus*.
2. Екстрактът от *Cotinus coggygria* притежава силен цитотоксичен ефект върху клетъчна линия от рак на млечната жлеза MCF7 (IC₅₀ - 40.6 µg/ml) и значителна антипролиферативна активност спрямо клетъчна линия от рак на яйчниците A2780 (IC₅₀ - 30.77 µg/ml) и линия MCF7 (IC₅₀ – 55.02 µg/ml).
3. Екстрактът от *C. coggygria* проявява:
 - проапоптотична активност спрямо клетъчна линия A2780;
 - способства за блокиране на клетъчния цикъл в S-фазата и индуцира процеси на апоптоза и автофагия в MCF7 клетки.
4. В MCF7 клетки екстрактът от *C. coggygria*:
 - оказва значителен генотоксичен ефект;
 - потиска способността на клетките да формират колонии;
 - повлиява съществено термодинамичното поведение на клетките, като регистрираните изменения насочват за процеси на денатурация на цитоплазмени и ядрени белтъци, и РНК;
 - показва тенденция за понижаване нивата на експресия на гени, кодиращи ДНК метилтрансферазните ензими DNMT1 и DNMT3a, и метил-CpG-свързващия белтък MBD3, но не оказва съществено въздействие върху експресията на *DNMT3b*, *MeCP2*, *MBD1*, *MBD2*, *MBD4* гените при третиране за период от 3 до 72 ч.
5. Хлороформна фракция на екстракта от *T. vulgare* показва значителен инхибиторен ефект върху клетъчната пролиферация на MCF7 клетки (IC₅₀ - 27.98 µg/ml) и A2780 клетки (IC₅₀ - 37.53 µg/ml).
6. Хлороформната фракция от *T. vulgare* индуцира блокиране на клетъчния цикъл в S-фазата и апоптоза в MCF7 клетки. В механизмите на анти tumorното ѝ действие вероятно не взема участие процесът на автофагия.

Формулирани са следните приноси:

1. За първи път е извършено експериментално проучване на *in vitro* антитуморните свойства на лечебните растения *Cotinus coggygia*, *Tanacetum vulgare* и *Cichorium intybus* от България. Установени са растителни видове с висок антитуморен потенциал.
2. Проведен е първият комплексен анализ на механизмите на антитуморния ефект на тотален водно-етанолов листен екстракт от *C. coggygia* върху човешки туморни клетъчни линии. Получените данни допринасят за разширяване на познанията за биологичните ефекти на екстракти от растението и подпомагат оценката на фармакологичния му потенциал.
3. Изследвани са за първи път някои от механизмите, обуславящи антитуморното действие на хлороформна фракция на екстракт от *T. vulgare*. Данните са предпоставка за последващи проучвания на фракцията като перспективен обект на по-задълбочени анализи.

7. ЛІТЕРАТУРА

- Abu-Dahab R, Afifi F. 2007.** Antiproliferative activity of selected medicinal plants of Jordan against a breast adenocarcinoma cell line (MCF7). *Sci Pharm*, 75: 121-136.
- Alvarez AL, Habtemariam S, Juan-Badaturuge M, Jackson C, Parra F. 2011.** *In vitro* anti HSV-1 and HSV-2 activity of *Tanacetum vulgare* extracts and isolated compounds: an approach to their mechanisms of action. *Phytother Res*, 25(2): 296-301.
- Anderson D, Yu TW, Phillips BJ, Schmezer P. 1994.** The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat Res*, 307: 261-271.
- Androutsopoulos V, Arroo RR, Hall JF, Surichan S, Potter GA. 2008.** Antiproliferative and cytostatic effects of the natural product eupatorin on MDA-MB-468 human breast cancer cells due to CYP1-mediated metabolism. *Breast Cancer Res*, 10(3): R39.
- Antal DS, Ardelean F, Pinzaru I, Borcan F, Ledefi I, Zupko I et al. 2016.** Effects of cyclodextrin complexation on the anti-cancer effects of *Cotinus coggygria* extract and its constituents, butein and sulfuretin. *Revista de chimie*, 67(8): 1618-1622.
- Artun FT, Karagoz A, Ozcan G, Melikoglu G, Anil S, Kultur S et al. 2016.** *In vitro* anticancer and cytotoxic activities of some plant extracts on HeLa and Vero cell lines. *J BUON*, 21(3): 720-5.
- Conforti F, Ioele G, Statti GA, Marrelli M, Ragno G, Menichini F. 2008.** Antiproliferative activity against human tumor cell lines and toxicity test on Mediterranean dietary plants. *Food Chem Toxicol*, 46(10): 3325-3332.
- Coté H, Boucher MA, Pichette A, Legault J. 2017.** Anti-Inflammatory, antioxidant, antibiotic, and cytotoxic activities of *Tanacetum vulgare* L. essential oil and its constituents. *Medicines*, 4: 34.
- Denev P, Petkova N, Ivanov I, Sirakov B, Vrancheva R, Pavlov A. 2014.** Determination of biologically active substances in taproot of common chicory (*Cichorium intybus* L.). *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, 18: 124-129.
- Duo J, Ying GG, Wang GW, Zhang L. 2012.** Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation. *Mol Med Rep*, 5(6): 1453-1456.
- Dzharov VV, Mishra AP, Shariati MA, Atanassova MS, Plygun S. 2016.** Phytochemical contents in solid-liquid extraction of aqueous alcoholic extract of chicory (*Cichorium intybus* L.) leaves. *Foods and Raw Materials*, 4(2): 32-37.
- Estévez S, Marrero MT, Quintana J, Estévez F. 2014.** Eupatorin-induced cell death in human leukemia cells is dependent on caspases and activates the mitogen-activated protein kinase pathway. *PLoS One*, 9(11): e112536.
- Ferrazzano GF, Roberto L, Catania MR, Chiaviello A, De Natale A, Roscetto E et al. 2013.** Screening and scoring of antimicrobial and biological activities of Italian vulnerary plants against major oral pathogenic bacteria. *Evid Based Compl Alternat Med*, 2013: 316280.
- Georgieva M, Stoilov L. 2008.** Assessment of DNA strand breaks induced by bleomycin in barley by the comet assay. *Environ Mol Mutagen*, 49(5): 381-387.
- Goun EA, Petrichenko VM, Solodnikov SU, Suhinina TV, Kline MA, Cunningham G. 2002.** Anticancer and antithrombin activity of Russian plants. *J Ethnopharmacol*, 81(3): 337-342.
- Hazra B, Sarkar R, Bhattacharyya S, Roy P. 2002.** Tumour inhibitory activity of chicory root extract against Ehrlich ascites carcinoma in mice. *Fitoterapia*, 73: 730-733.
- Hsieh CR, Yu PJ, Chen LG, Chaw SM, Chang CC, Wang CC. 2010.** Cytotoxic constituents of *Hydrangea angustipetala* on human gastric carcinoma cells. *Bot Studies*, 51: 45-51.

- Joshi B, Li L, Taffe B, Zhu Z, Wahl S, Tian H et al. 1999.** Apoptosis induction by a novel anti-prostate cancer compound, BMD188 (a fatty acid containing hydroxamic acid), requires the mitochondrial respiratory chain. *Cancer Res*, 59: 4343-4355.
- Kala R, Shah HN, Martin SL, Tollefsbol TO. 2015.** Epigenetic-based combinatorial resveratrol and pterostilbene alters DNA damage response by affecting SIRT1 and DNMT enzyme expression, including SIRT1-dependent γ -H2AX and telomerase regulation in triple-negative breast cancer. *BMC Cancer*, 15: 672.
- Karantza-Wadsworth V, White E. 2007.** Role of autophagy in breast cancer. *Autophagy*, 3(6): 610-613.
- Kong A, Yu R, Chen C, Mandlekar S, Primiano T. 2000.** Signal transduction events elicited by natural products: Role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis. *Arch Pharm Res*, 23(1): 1-16.
- Lee KT, Kim JI, Park HJ, Yoo KO, Han YN, Miyamoto KI. 2000.** Differentiation inducing effect of magnolialide, a 1 β -hydroxyeudesmanolide isolated from *Cichorium intybus*, on human leukemia cells. *Biol Pharm Bull*, 23: 1005-1007.
- Liu Q, Jiang H. 2017.** *In vitro* cytotoxicity of *Tanacetum vulgare* mediated silver nanoparticles against breast cancer (MCF-7) cell lines. *Biomed Res*, 28(3): 1354-1358.
- Lorin S, Hamaï A, Mehrpour M, Codogno P. 2013.** Autophagy regulation and its role in cancer. *Semin Cancer Biol*, 23: 361-79.
- Malhotra V, Perry MC. 2003.** Classical chemotherapy: mechanisms, toxicities and the therapeutic window. *Cancer Biol Ther*, 2(4 Suppl 1): S2-S4.
- Maurya D, Nandakumar N, Devasagayam T. 2011.** Anticancer property of gallic acid in A549, a human lung adenocarcinoma cell line, and possible mechanisms. *J Clin Biochem Nutr*, 48(1): 85-90.
- Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. 2000.** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*, 52: 673-751.
- Mosmann T. 1983.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2): 55-63.
- Müller C, Readhead C, Diederichs S, Idos G, Yang R, Tidow N et al. 2000.** Methylation of the cyclin A1 promoter correlates with gene silencing in somatic cell lines, while tissue-specific expression of cyclin A1 is methylation independent. *Mol Cell Biol*, 2000: 3316-3329.
- Nawab A, Yunus M, Ali Mahdi A, Gupta S. 2011.** Evaluation of anticancer properties of medicinal plants from the Indian sub-continent. *Mol Cell Pharmacol*, 3(1): 21-29.
- Neergheen V, Bahorun T, Taylor E, Jen L, Aruoma O. 2009.** Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. *Toxicology*, 278: 229-241.
- Nguyen TT, Tran E, Nguyen TH, Do PT, Huynh TH, Huynh H. 2004.** The role of activated MEL-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. *Carcinogenesis*, 25: 647-659.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. 1991.** A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, 139(2): 271-279.
- Nikolova M, Evstatieva L, Nguyen TD. 2011.** Screening of plant extracts for antioxidant properties. *Botanica Serbica*, 35: 43-48.
- Pfaffl MW. 2001.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9): e45.
- Pollio A, Zarrelli A, Romanucci V, Di Mauro A, Barra F, Pinto G et al. 2016.** Polyphenolic profile and targeted bioactivity of methanolic extracts from Mediterranean ethnomedicinal plants on human cancer cell lines. *Molecules*, 21(4): 395.

- Pool-Zobel BL. 2005.** Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. *Br J Nutr*, 93: S73-S90.
- Ramírez-Erosa I, Huang Y, Hickie RA, Sutherland RG, Barl B. 2007.** Xanthatin and xanthosin from the burs of *Xanthium strumarium* L. as potential anticancer agents. *Can J Physiol Pharmacol*, 85(11): 1160-1172.
- Rao S, Tortola L, Perlot T, Wirnsberger G, Novatchkova M, Nitsch R et al. 2014.** A dual role for autophagy in a murine model of lung cancer. *Nat Commun*, 5: 3056.
- Rosselli S, Bruno M, Raimondo FM, Spadaro V, Varol M, Koparal AT et al. 2012.** Cytotoxic effect of eudesmanolides isolated from flowers of *Tanacetum vulgare* ssp. *siculum*. *Molecules*, 17: 8186-8195.
- Ruela-de-Sousa RR, Fuhler GM, Blom N, Ferreira CV, Aoyama H, Peppelenbosch MP. 2010.** Cytotoxicity of apigenin on leukemia cell lines: implications for prevention and therapy. *Cell Death Dis*, 1: e19.
- Saleem M, Abbas K, Naseer F, Ahmad M, Syed NH, Javed F et al. 2014.** Anticancer activity of n-hexane extract of *Cichorium intybus* on lymphoblastic leukemia cells (Jurkat cells). *Afr J Plant Sci*, 8(6): 315-319.
- Savikin K, Zdunic G, Jankovic T, Stanojkovic T, Juranic Z, Menkovic N. 2009.** *In vitro* cytotoxic and antioxidative activity of *Cornus mas* and *Cotinus coggygria*. *Nat Prod Res*, 23(18): 1731-1739.
- Shukla S, Meeran SM, Katiyar SK. 2014.** Epigenetic regulation by selected dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. *Cancer Lett*, 355: 9-17.
- Sohi KK, Mittal N, Hundalmk, Khanduja KL. 2003.** Gallic acid, an antioxidant, exhibits anti apoptotic potential in normal human lymphocytes: a cl-2 independent mechanism. *J Nutr Sci Vitaminol*, 49: 221-227.
- Sung B, Chung HY, Kim ND. 2016.** Role of apigenin in cancer prevention via the induction of apoptosis and autophagy. *J Cancer Prev*, 21(4): 216-226.
- Thakur VS, Deb G, Babcook MA, Gupta S. 2014.** Plant phytochemicals as epigenetic modulators: role in cancer chemoprevention. *AAPS J*, 16(1): 151-163.
- Wang G, Wang J, Du L, Li F. 2015.** Effect and mechanism of total flavonoids extracted from *Cotinus coggygria* against glioblastoma cancer *in vitro* and *in vivo*. *BioMed Res Int*, 2015: 856349.
- Wegiera M, Smolarz HD, Druch MJ, Korczak M, Kopro K. 2012.** Cytotoxic effect of some medicinal plants from Asteraceae family on J-45.01 leukemic cell line-pilot study. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 69(2): 263-268.
- Woyanarowski JM, Konopa. 1981.** Inhibition of DNA biosynthesis in HeLa cells by cytotoxic and antitumor sesquiterpene lactones. *J Mol Pharmacol*, 19:97.
- Yin F, Giuliano AE, Law RE, Van Herle AJ. 2001.** Apigenin inhibits growth and induces G2/M arrest by modulating cyclin-CDK regulators and ERK MAP kinase activation in breast carcinoma cells. *Anticancer Research*, 21: 413-420.
- Zhang X, Ling Y, Yu H, Ji Y. 2010.** Studies on mechanism of myricetin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG-2 cells. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, 35(8): 1046-1050.
- Zhao M, Ma J, Zhu HY, Zhang XH, Du ZY, Xu YJ, Yu XD. 2011.** Apigenin inhibits proliferation and induces apoptosis in human multiple myeloma cells through targeting the trinity of CK2, Cdc37 and Hsp90. *Mol Cancer*, 10: 104.
- Павлов Д. 2015.** Проучване на антиоксидантното, противовъзпалително и противодиабетно действие на екстракти от *Cotinus coggygria* в експериментални модели с опитни животни и клетъчни култури. (Дисертация).

ПУБЛИКАЦИИ, НАУЧНИ ПРОЯВИ, ЦИТАТИ, УЧАСТИЯ В ПРОЕКТИ И СПЕЦИАЛИЗАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Научни публикации по темата на дисертацията:

1. **Gospodinova Z**, Antov G, Angelova S, Krasteva M. 2014. *In vitro* antitumor potential of Bulgarian *Tanacetum vulgare* L. on human breast adenocarcinoma cells. International Journal of Pharma Sciences, 4(2): 468-472.
2. **Gospodinova Z**, Krasteva M. 2015. *Cichorium intybus* L. from Bulgaria inhibits viability of human breast cancer cells *in vitro*. Genetics and Plant Physiology, 5(1): 15-22.
3. **Gospodinova Z**, Bózsity N, Ocsosvzki I, Orbán-Gyapai O, Krasteva M, Zupkó I. 2015. Chloroformic fraction of *Tanacetum vulgare* L. induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF7 cells. International Journal of Pharma Sciences 5(2): 986-990.
4. **Gospodinova Z**, Bózsity N, Nikolova M, Krasteva M, Zupkó I. 2017. Antiproliferative properties against human breast, cervical and ovarian cancer cell lines, and antioxidant capacity of leaf aqueous ethanolic extract from *Cotinus coggygria* Scop. Acta Medica Bulgarica (под печат) (SJR: 0.105).

Участия в научни форуми във връзка с темата на дисертацията:

1. **Gospodinova Z**, Antov G, Krasteva M. Investigation of *in vitro* antitumor effect of Bulgarian medicinal plants *Cotinus coggygria* Scop. and *Cichorium intybus* L. on human breast cancer cell line MCF7. Научна конференция “Plant Physiology and Genetics – Achievements and Challenges”, 24-26 Септември 2014 г., София, България, pp.55-56. (Постер).
2. **Gospodinova Z**, Antov G, Christova R, Krasteva M. Extracts from *Tanacetum vulgare* L. and *Cotinus coggygria* Scop. exert a lower *in vitro* inhibitory effect on normal mammary epithelial cell viability than on breast cancer. “9th International Conference of Anticancer Research”, 6-10 Октомври 2014 г., Порто Карас, Ситония, Гърция, (Постер); Резюме публикувано в научно списание Anticancer Research. 34, 2014, 5928 (IF: 1.826).
3. **Gospodinova Z**, Zupkó I, Bózsity N, Georgieva M, Ocsosvzki I, Krasteva M. Genotoxic, cytostatic and proapoptotic effects of leaf aqueous ethanolic extract from Bulgarian *Cotinus coggygria* Scop. in breast cancer cells *in vitro*. 9th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries – 9th СМАРSЕЕС, 26 – 29 Май 2016 г., Пловдив, България, (Постер).
4. **Gospodinova Z**, Krasteva M, Todinova S, Taneva S, Manova V. Effects of leaf extract from Bulgarian *Cotinus coggygria* on thermodynamic properties and epigenetic events in human breast cancer cells *in vitro*. 3-rd International Conference on Natural Products Utilization: from Plants to Pharmacy Shelf (ICNPU-2017), 18-21 Октомври, 2017 г., Банско, България (Постер).

Списък на забелязани цитати:

Gospodinova Z, Krasteva M. 2015. *Cichorium intybus* L. from Bulgaria inhibits viability of human breast cancer cells *in vitro*. Genetics and Plant Physiology. 5(1): 15-22.

1. Jaikumar B, Jasmine R. 2016. A Review on a few medicinal plants possessing anticancer activity against human breast cancer. International Journal of PharmTech Research, 9(3): 333-365.
2. Singh S, Sharma B, Kanwar SS, Kumar A. 2016. Lead phytochemicals for anticancer drug development. Front Plant Sci, 7: 1667.
3. Pruteanu A, Vladut M, Matache M, Muscalu A, Ungureanu N. Characterization of chicory herb (*Cichorium intybus*) of separation process on length of flat vibrating sieves. 45th Symposium "Actual Tasks on Agricultural Engineering", Croatia, 2017

Gospodinova Z, Antov G, Angelova S, Krasteva M. 2014. *In vitro* antitumor potential of Bulgarian *Tanacetum vulgare* L. on human breast adenocarcinoma cells. International Journal of Pharma Sciences, 4(2): 468-472.

1. Barbara I. Tansy. 2015. Adaikpoh Mecklenburgh Square Garden.
2. Devrnja N, Anđelković B, Arandžlović S, Radulović S. 2017. Comparative studies on the antimicrobial and cytotoxic activities of *Tanacetum vulgare* L. essential oil and methanol extracts. South African Journal of Botany, 111: 212-221.
3. Devrnja N. *In vitro* propagacija i biološka aktivnost metanolnih ekstrakata i etarskog ulja povratiča (*Tanacetum vulgare* L.), 2017 (Disertation).

Участие в проекти във връзка с дисертационния труд:

BG051PO001-3.3.06-0025 „Подкрепа за изграждане и развитие на млад конкурентноспособен научен потенциал в областта на физиологията, фитохимията, геномиката, протеомиката и биоразнообразието на еукариотните организми“ Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси“, съфинансирана от Европейския социален фонд на Европейския съюз. Ръководител: доц. д-р Леонид Пенков

ДФНП-208/16.05.2016 по Програма за подпомагане на младите учени в БАН на тема „Епигенетични модулаторни ефекти на българското лечебно растение *Cotinus coggygria* Scop. в човешки туморни клетки *in vitro*“, Ръководител: Златина Господинова, Научен ръководител: гл. ас. д-р Василиса Манова

Специализации във връзка с дисертационния труд:

Специализация в Катедра „Фармакодинамика и биофармация“, Университет на Сегед, Унгария на тема: „Флуцитометричен анализ на туморни клетки след третиране с тотални екстракти от български лечебни растения“, ноември, 2014, по проект BG051PO001-3.3.06-0025.