

ОТЧЕТ ПО ПРОЕКТ ЗА НАУЧНО И КАРИЕРНО РАЗВИТИЕ
НАЦИОНАЛНА ПРОГРАМА „МЛАДИ УЧЕНИ И ПОСТДОКТОРАНТИ“ - II ЕТАП
МОДУЛ „ПОСТДОКТОРАНТИ“

**Тема: „В търсене на ценни за човека имуномодулиращи
полизахариди в микро- и макроорганизми на Земята“**

Научно звено: Лаборатория по биологично активни вещества - Пловдив

Участник:.....

/гл. ас. д-р инж. Йордан Георгиев/

Научен консултант:.....

/проф. д-р инж. Петко Денев/

гр. София, 04.02.2021 г.

Основни използвани съкращения (повторения ≥ 3 ; без включване на имената на изследваните микробни щамове)

Анхидроуроново съдържание (**АУС**); Млечнокисели бактерии (**МКБ**); Общи полифеноли (**ОПФ**); Оптична плътност (**ОП**); Полизахариди (**ПЗ**); Полизахариден комплекс (**ПЗК**); Реактивни форми на кислорода (**РФК**); Стомашно-чревен тракт (**СЧТ**); тролокс еквиваленти (**ТЕ**); Уронови киселини (**УК**); Ядрено-магнитен резонанс (**ЯМР**).

ПЗК от биомаса на *Anabaena laxa* (**AL-PSC**); Кристал виолет (**CV**); Инфрачервена спектроскопия с трансформация на Фурие (**FT-IR**); Еквиваленти галова киселина (**GAE**); ПЗК от корените на кръвен здравец *Geranium sanguineum* (**GSR-PSC**); ПЗК от листата на кръвен здравец *G. sanguineum* (**GSL-PSC**); Hydroxyl radical averting capacity (**HORAC**); 3-дезоксид-манно-2-октулозонова киселина (**Kdo**); ПЗК от плодните тела на гъбата сърнела *Macrolepiota procera* (**MP-PSC**); Хранителна среда на De Man Rogosa Sharpe (**MRS**); Опсонизирани зимосанови частици (**OZP**); ПЗК от биомаса на *Oscillatoria limosa* (**OL-PSC**); Oxygen radical absorbance capacity (**ORAC**); Форбол 12-миристат 13-ацетат (**PMA**); ПЗК от биомаса на *Phormidesmis molle* (**PM-PSC**); Протеин киназа С (**PKC**).

Резюме на резултатите по проекта от първи етап

Целта на настоящия проект е да се сравнят химичното разнообразие и имуномодулиращата активност на водно-екстрахируеми ПЗ от няколко биологични вида с различаваща се физиология. Като източници на водно-екстрахируеми ПЗК бяха използвани цианобактериите *Anabaena laxa* A. Braun, *Oscillatoria limosa* C. Agardh ex Gomont и *Phormidesmis molle* Gomont, както и корените и листата на билката кръвен здравец *Geranium sanguineum*, и плодните тела на гъбата сърнела *Macrolepiota procera*. През първия етап на проекта получените комплекси бяха подложени на химична характеристика чрез спектрофотометрични и хроматографски методи, ЯМР и FT-IR спектроскопия. След това бяха оценени и техните *ex vivo* имуномодулиращи свойства върху човешки бели кръвни клетки и *in vitro* цитотоксично действие срещу човешки нормални и туморни клетъчни линии. Общото въглехидратно съдържание в пробите варираше между 53% и 76.8%. Комплексите от бактериите съдържаха ПЗ, които бяха изградени предимно от неутрални фрагменти, богати на Glc, Gal или Xyl и бедни на УК (GalA и GlcA). GSL-PSC беше съставен предимно от пектини с високо съдържание на хомогалактуронан и по-малки рамногалактуронан тип I региони, с разклонения от арабиногалактани. GSR-PSC представляваше смес от α -1,4-глюкани, последвани от пектини с по-ниско количество хомогалактуронан и наличие на 1,(3)5-свързани α -арабинани. MP-PSC беше смес от неутрални ПЗ, представени от α - и β -глюкани, α -фуко-2-(1,6)-галактан и ацетилян β -глюкоманан. GSR-PSC прояви най-високата *ex vivo* имуномодулираща активност от шесте комплекса, с ясно изразено имуностимулиращо действие. Пробата предизвика имунен отговор в човешка кръв чрез стимулиране на моноцити, гранулоцити и клетки от придобития имунитет, като Т хелперни клетки и В клетки, в нормално и активирано състояние. AL-PSC и OL-PSC (50-200 $\mu\text{g/mL}$) показаха добра *in vitro* цитотоксична активност срещу човешки колоректален аденокарцином (HT-29) и аденокарцином на дебелото черво (LS-180), засягайки лизозомната активност на клетките. Тоталният органичен екстракт от *A. laxa* се откри с най-висока *in vitro* антиоксидантна активност, като фитохимичните анализи разкриха, че той съдържа различни въглехидрати, висши мастни киселини (вкл. ненаситени) и други продукти от метаболизма на триацилглицероли, метаболити от цикъла на Кребс, терпени, фенолни киселини и флавоноиди.

Резултатите от първия етап на проекта бяха представени на национален семинар по медицинска биохимия, научна конференция в СУ „Климент Охридски“, специализирана конференция по ПЗ в Прага, публична лекция в ПУ „Паисий Хилендарски“ и в списание Природа на БАН.

Резюме на резултатите по проекта от втори етап

През втория етап на проекта беше довършена химичната характеристика на получените ПЗК. Имунологичните анализи бяха продължени само с комплексите от кръвен здравец и сърнела, като беше включено и оценяване на ефектите им върху пробиотични и патогенни бактерии. В резултат на химичните анализи беше установено, че цианобактериалните ПЗК съдържат невъглехидратни и UV-абсорбиращи съединения, като белтъци, нуклеинови киселини (1.6-10.8%) и следови количества феноли (0.2-0.3%). ПЗ-те в бактериалните комплекси не бяха сулфатирани. Общото уроново съдържание в тези проби беше ниско и то варираше между 0.5% (PM-PSC) и 5.3% (OL-PSC), като пробите съдържаха редкия монозахарид Kdo. Високото количество Glc в GSR-PSC се дължеше в значителна степен на съдържанието на нишесте (26.2%), а в MP-PSC на гликоген (27.2%). Пектините в GSL-PSC и GSR-PSC бяха високометоксилирани, а степента им на ацетилиране беше 23.8% и 27.6%, съответно. GSL-PSC съдържаше Kdo, което се свързваше с наличие на рамногалактуронан тип II в пектините от тази проба. MP-PSC активира продукцията на РФК от кръвни фагоцити по дозозависим начин при концентрации от 50 до 200 µg/mL. GSR-PSC се откри с *in vitro* противовъзпалителна активност и стимулира (2%, w/v) образуването на биофилм от най-голям брой пробиотични щамове на МКБ, изолирани от различни млечни продукти и хора. Едновременно с това, комплексите (2%, w/v) потиснаха образуването на биофилм от патогенни щамове на *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* и *Salmonella enterica* след 96 h третиране. Антиоксидантната активност на пробите от кръвния здравец и сърнелата, измерена по ORAC и HORAC методите, беше ниска и в съответствие с ниското съдържание на общи феноли (вкл. общи флавоноиди) в тях. Накрая беше проведено пречистване и фракциониране на ПЗ-те в GSR-PSC, тъй като пробата се откри в биологичните изследвания, в двата етапа, с най-висока активност. В резултат на хроматографския анализ бяха получени 1 неутрална и 5 кисели фракции за последващи структурни изследвания и оценка на биологичната активност.

През втория етап на проекта бяха подготвени две експериментални статии за списания *Algal Research* (подадена на 30.11.2020 г.) и *International Journal of Biological Macromolecules* на издателство Elsevier, и една научно-популярна статия за списание *Природа* на БАН. Резултатите от проекта бяха представени с устен доклад на международна конференция в страната и с пленарен доклад на конференция по ПЗ в Чехия. Успешното представяне на проекта на форума в страната донесе и една награда. Благодарение на реализирането на постдокторантския проект беше подготвен и подаден международен проект с учени от Руската академия на науките към Фонд „Научни изследвания“ и Руската фондация за фундаментални изследвания.

Изпълнението на част от предвидените дейности в Работната програма по проекта за втория етап беше блокирано поради коронавирусната инфекция през 2020 г. и затова работата по този етап продължава. В **Приложение 9** е представена Работната програма при реализиране на трети етап по постдокторантския проект.

1. Въведение (анотация на проекта, цели, работна програма, предвидени дейности - до 2 стр.)

Тенденциозното нарастване на приложението на ПЗ-те в храните, козметичните продукти и лекарствата изисква по-задълбочено изучаване на структурата и ефектите им върху организма. С помощта на животински модели и клинични изследвания е доказано, че имуномодулиращите ПЗ са полезни при редица социалнозначими заболявания, като диабет тип 2, сърдечно-съдови, ракови, хронични възпалителни и автоимунни заболявания, затлъстяване и др. (Georgiev et al., 2018). ПЗ-те могат да се използват като храна от пробиотични коменсални бактерии или да стимулират прилепването им към чревната мукоза, и по този начин да доведат до здравословни ефекти, подобряващи имунитета (Cockburn & Koropatkin, 2016). Като обещаващи източници на имуномодулиращи ПЗ могат да бъдат разглеждани различни биологични видове, някои от които са известни от храненето или етномедицината, а други са слабоизучени и все още не са намерили приложение. Ето защо, целта на настоящия проект е да се сравнят химичното разнообразие и имуномодулиращата активност на водно-екстрахируемите ПЗ от няколко биологични вида с различаваща се физиология. Като източници на водно-екстрахируеми ПЗК бяха използвани цианобактериите *Anabaena laxa*, *Oscillatoria limosa* и *Phormidesmis molle*, както и корените и листата на билката кръвен здравец *Geranium sanguineum*, и плодните тела на гъбата сърнела *Macrolepiota procera*. През втория етап беше включено и оценяването на ефектите на комплексите от кръвен здравец и сърнела върху пробиотични и патогенни бактерии. Липсата на достатъчно данни за молекулите отговорни за проявление на имуностимулиращо и противовъзпалително действия от екстракти на кръвен здравец и сърнела ни накара да хипотезираме, че ПЗ-те вероятно са свързани с тези активности. В литературата беше намерена оскъдна информация само за ПЗ-те от сърнелата и то за дълбочинно култивирана гъба, като нашите подробни структурни изследвания от първия етап показаха, че съществуват известни различия с диворастящия вид. Цианобактериите, които са едни от най-древните организми на Земята, бяха включени в проекта с цел търсене на нови източници на биоактивни гликани.

Вторият етап на проекта беше одобрен със следната Работна програма:

1. Провеждане на двустъпално хроматографско пречистване и фракциониране на ПЗК от листата на кръвния здравец (GSL-PSC) и плодните тела на сърнелата (MP-PSC) чрез анионобменна и елиминираща по размери хроматография.
2. Първична химична характеристика на получените фракции чрез определяне на общи захари, общи УК, монозахариден състав, молекулна маса и хетерогенност, наличие на естери, общ белтък и общи феноли.
3. Изследване на биологичната активност на получените ПЗ-дни фракции.
 - 3.1. Определяне на евентуалното замърсяване на пречистените фракции с липополизахариди.
 - 3.2. Определяне на имуномодулиращата активност на фракциите.
 - 3.2.1. Оценяване на *ex vivo* активирането на човешки неутрофили от фракциите чрез продукцията на РФК.
 - 3.2.2. Оценяване на *in vitro* активирането на миши макрофаги от фракциите чрез продукцията на NO. Определяне продукцията на някои про- и противовъзпалителни цитокини от третираните клетки.
 - 3.3. Определяне на пребиотичната активност на фракциите чрез използване на български пробиотични щамове МКБ.
4. Изследване на връзката структура-активност на пречистените ПЗ-дни фракции.

- 4.1. Провеждане на FT-IR и двумерен ЯМР спектроскопски анализи за частично изследване на първичната структура на активните фракции.
- 4.2. Провеждане на специфични ензимни модификации на гъбните неутрални хетерополизахариди (с глюкоманан- и/или фукогалактан-разграждащи ензими) и/или на пектиновите ПЗ от листата на здравеца (с хомогалактуронан- и рамногалактуронан-разграждащи ензими).
- 4.3. Хроматографско разделяне на ензимно-модифицираните продукти и определяне на техния монозахариден състав.
- 4.4. Оценяване на имуномодулиращия и пребиотичния потенциали на структурно модифицираните фракции по установените методи.
5. Приготвяне на лиофилизиран ПЗ-съдържащ екстракт от сърнелата и/или здравеца.
- 5.1. Фитохимичен анализ на ПЗ-дния екстракт чрез определяне на общи феноли, общи флавоноиди, съдържание на индивидуални фенолни киселини и флавоноиди, органични киселини, свободни захари и ПЗ.
- 5.2. Определяне на *in vitro* антиоксидантната активност на получения екстракт.
6. Представяне на проекта и изготвяне на крайния отчет.
- 6.1. Подготвяне и подаване за рецензиране на една експериментална научна статия, с импакт фактор, в специализирано за въглехидрати списание от издателство Elsevier (напр. Carbohydrate Polymers или International Journal of Biological Macromolecules).
- 6.2. Подготвяне и подаване за рецензиране на една научно-популярна статия по тематиката на проекта (напр. списание Природа).
- 6.3. Представяне на получените резултати на една научна конференция в страната и на една конференция в чужбина.
- 6.4. Изготвяне на крайния отчет.

Съгласно Работната програма, през втория етап изследванията трябваше да продължат само с пробите GSL-PSC и MP-PSC, и пречистените от тях ПЗ. За целта беше предвидено постдокторантът да проведе част от експериментите във външни научни организации. Хроматографското пречистване на ПЗ-те беше планирано в Университет по хранителни технологии – Пловдив, анализите с човешки левкоцити в Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“ и Институт по биофизика към Чешката академия на науките, и изследванията с МКБ в Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ към БАН. Структурните изследвания и ензимните модификации на ПЗ-те, получаването и фитохимичната характеристика на ПЗ-ния екстракт от кръвен здравец и/или сърнела, бяха предвидени за изпълнение в рамките на ИОХЦФ-БАН. На практика, обаче, инфекцията с вируса SARS-CoV-2 в страната от март 2020 г., която прерасна в пандемия в световен мащаб, попречи на провеждането на част от планираните експерименти. Това наложи промяна в Работната програма, съобразно динамично изменящите се работни условия в страната. Затова в настоящия етап беше проведена допълнителна химична характеристика на получените ПЗК и бяха оценени биологичните ефекти на пробите от кръвен здравец и сърнела върху кръвни фагоцити, пробиотични и патогенни бактерии. Това позволи подготвянето на две експериментални научни статии от общо три планирани публикации за двата етапа. Освен това беше проведено пречистване и фракциониране на ПЗ-те в GSR-PSC, тъй като пробата се откри в биологичните изследвания в двата етапа с най-висока активност. По принцип тази задача беше планирана за изпълнение в края на първия етап.

Изследванията от настоящия проект са проведени през 2020 г., като не са представени резултати от предходни приключили проекти на постдокторанта.

2. Резултати и обсъждане (до 10 стр.)

2.1. Допълнителна химична характеристика на ПЗК, получени от цианобактерии, кръвен здравец и сърнела

Резултатите от характеристиката на ПЗК от цианобактериите са представени в **Табл. 1**. АУС на AL-PSC, OL-PSC и PM-PSC беше 4.2, 5.3 и 0.5%, съответно. АУС беше определено на анализатор Skalar San++ (Analytical BV), съгласно метода на Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973) и процедурите на Ahmed & Labavitch (1978) и Thibault (1979), с използване на GalA като стандарт. Ниското АУС беше в съгласие с данните от монозахаридния анализ. Това потвърждава, че УК не са основни градивни единици в изследваните ПЗ. Пробите дадоха положителна реакция за наличието на редкия монозахарид Kdo, сравнявайки интензитета на характерния розов цвят на тестовите проби и лавандулов пектин chPS-L2 (Georgiev et al., 2017a), използван като положителна контрола. Качественият тест за Kdo беше проведен по метода описан от York et al. (1985). Остава въпросът как този мономер е свързан в ПЗ-те. Kdo може да произхожда и от цианобактериалните липополизахариди, които напоследък привличат внимание, защото могат да служат като антагонисти на TLR4, блокиращи ендотоксиновия шок, предизвикан от инфекции с Грам-отрицателни бактерии (Durai et al., 2015). Цианобактериите често съдържат сулфатирани ПЗ, поради което беше проверено наличието на $-SO_4$ групи в ПЗК. Търговски κ -карагенан (Serva) беше използван като положителна контрола, за която беше определено сулфатно съдържание от $6.3 \pm 0.1\%$, но тестваните ПЗ не бяха сулфатирани. Анализът беше проведен по метода на Dodgson & Price (1962), с използване на K_2SO_4 като стандарт.

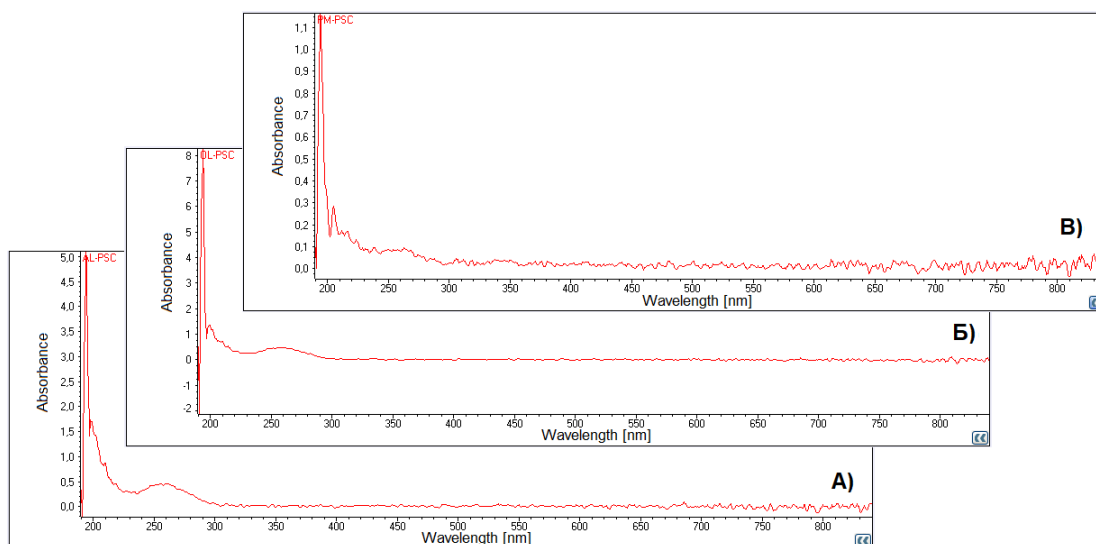
Таблица 1. Допълнителна химична характеристика на ПЗК от *A. laxa* (AL-PSC), *O. limosa* (OL-PSC) и *P. molle* (PM-PSC)

Параметри	AL-PSC	OL-PSC	PM-PSC
АУС [%]	4.2 ± 0.03	5.3 ± 0.1	0.5 ± 0.04
Сулфатно съдържание [%]	н.н. ^a	н.н.	н.н.
Наличие на Kdo	следи	++	++
Нуклеинови к-ни [%]	9.9 ± 0.1	10.8 ± 0.1	1.6 ± 0.01
Общ белтък [%] ^b	3.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1	н.а. ^b
Общи феноли [%]	0.3 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.3 ± 0.01

^aНе е намерено (н.н.); ^bОпределен по метода на Брадфорд; ^cНе е анализирано (н.а.).

Наред със структурните особености на бактериалните ПЗ беше важно да се оцени наличието на някои невъглехидратни съединения в пробите, защото те могат да повлияят биологичната им активност. От проведения FT-IR анализ на комплексите през първия етап бяха открити характеристични ивици на поглъщане за протеини и нуклеинови киселини в спектрите. В резултат на изследванията през втория етап беше установено, че ПЗК съдържат незначителни количества общи феноли (0.2-0.3%), но и други УВ-поглъщащи съединения, като белтъци и нуклеинови киселини (1.6-10.8%). Общите феноли и белтъка бяха определени по методите на Singleton & Rossi (1965) и Bradford (1976), при стандарти ферулова киселина и говежди серумен албумин, съответно. От UV-Vis абсорбционните спектри на комплексите (**фиг. 1**) се откриха пикове в областите около 260 и 280 nm, което показва присъствието на нуклеинови киселини, белтъци и др. съединения. Спектрите бяха снимани на спектрофотометър NanoDropTM 2000 UV-Vis (Thermo ScientificTM), контролиран от софтуер NanoDropTM 2000/2000с, който беше използван и за изчисление на съдържанието на нуклеинови киселини. Наличието на

нуклеинови киселини в комплексите наложи повторно анализиране на монозахаридния състав. Анализът беше проведен чрез GC-FID на Trace™ 1300 GC (Thermo Fisher Scientific™) по метода описан от Chambers & Clamp (1971), с модификация на Nyman et al. (2016). При ревизиране на монозахаридния състав беше открита рибоза в AL-PSC (2.9mol%) и OL-PSC (1.9mol%), което беше в съответствие с данните за съдържание на нуклеинови киселини в двете проби (Табл. 1). Резултатите от определянето на белтъчното съдържание по метода на Брадфорд бяха доста ниски (AL-PSC= 3.4% и OL-PSC= 1.3%), съблюдавайки факта, че присъствието на протеини беше детектирано при FT-IR анализа. Това постави под съмнение приложността на метода на Брадфорд за анализ на тези проби. Не беше възможно определянето на белтъка в комплексите и като се използват стандартни протеинови разтвори, и се измерва абсорбцията при 280 nm, поради интерференцията от други УВ-абсорбиращи молекули. Количествено определяне на протеините по метода на Kjeldahl (Bradstreet, 1965) не е направено поради малките количества, в които бяха получени комплексите. По същата причина не беше анализирана и пробата PM-PSC по метода на Брадфорд.



Фиг. 1. UV-Vis спектри на ПЗК от *A. laxa* (AL-PSC, A)), *O. limosa* (OL-PSC, Б)) и *P. molle* (PM-PSC, В))

Резултатите от допълнителната характеристика на ПЗК от кръвен здравец и сърнела са представени в Табл. 2. В предходния етап беше определено, че общото съдържание на въглехидрати в GSL-PSC, GSR-PSC и MP-PSC беше 73.6%, 76.8% и 74.1%, съответно. Общите захари бяха определени по метода на Dubois et al. (1956), с използване на стандарт от Glc и смес от Gal и GalA (1:1.5). GSR-PSC и MP-PSC имаха високо съдържание на Glc – 50mol% и 62.3mol%. Ето защо беше важно да се определи съдържанието на нишесте в тях. От анализа беше установено, че GSL-PSC съдържаше само 0.6% нишесте, но количеството му в GSR-PSC и гликогенът в MP-PSC бяха относително високи, заемайки съответно 20.1% и 27.3% от общото количество въглехидрати. Нишестето беше определено по метода описан от Hall (2015).

Пектините в GSL-PSC и GSR-PSC бяха високометоксилирани, както се и очакваше ПЗ-те в MP-PSC не съдържаха метилови естери. Степента на ацетилиране на пектините в GSL-PSC и GSR-PSC беше 23.8mol% и 27.4%. От ЯМР анализа на MP-PSC

беше предположено, че част от ПЗ-те в пробата са ацетилирани (напр. глюкомананите), като ацетилирането беше потвърдено и в настоящия етап (**Табл. 2**). Степента на метоксилиране и ацетилиране бяха определени съгласно Anthon & Barrett (2008) (метанол като стандарт) и McComb & McCready (1957) (β -D-пентаацетилглюкоза като стандарт). GSL-PSC съдържаше Kdo. Това в допълнение с откриването на Fuc в пробата може да бъде свързано с наличието на силно разклонения и консервативен рамногалактуронан тип II регион, тъй като тези захари са градивни елементи в страничните му вериги.

Таблица 2. Допълнителна химична характеристика на ПЗК от листа (GSL-PSC) и корени (GSR-PSC) на кръвен здравец, и плодни тела на сърнела (MP-PSC)

Параметри	GSL-PSC	GSR-PSC	MP-PSC
Съдържание на нишесте [%]	0.6±0.04	26.2±0.1	27.2±0.1
Степен на метоксилиране [mol%] ^a	61.9±0.1	70.2±1.0	н.н. ^б
Степен на ацетилиране [mol%] (Ацетилно съдържание [%]) ^a	23.8±0.4 (3.2±0.1)	27.4±0.7 (1.6±0.04)	- (0.3)
Наличие на Kdo	++	н.н.	н.н.
Общ белтък [%] ^б	0.6±0.02	2.8±0.1	12.7±0.2
Общи феноли [%]	1.0±0.03	4.4±0.1	1.7±0.02
Общи флавоноиди [mg/ 100 g]	4.1±0.1	1.0±0.1	2.6±0.1

^aмолове метоксилни или ацетилни групи за 100 мола GalA; ^бНе е намерено (н.н.);

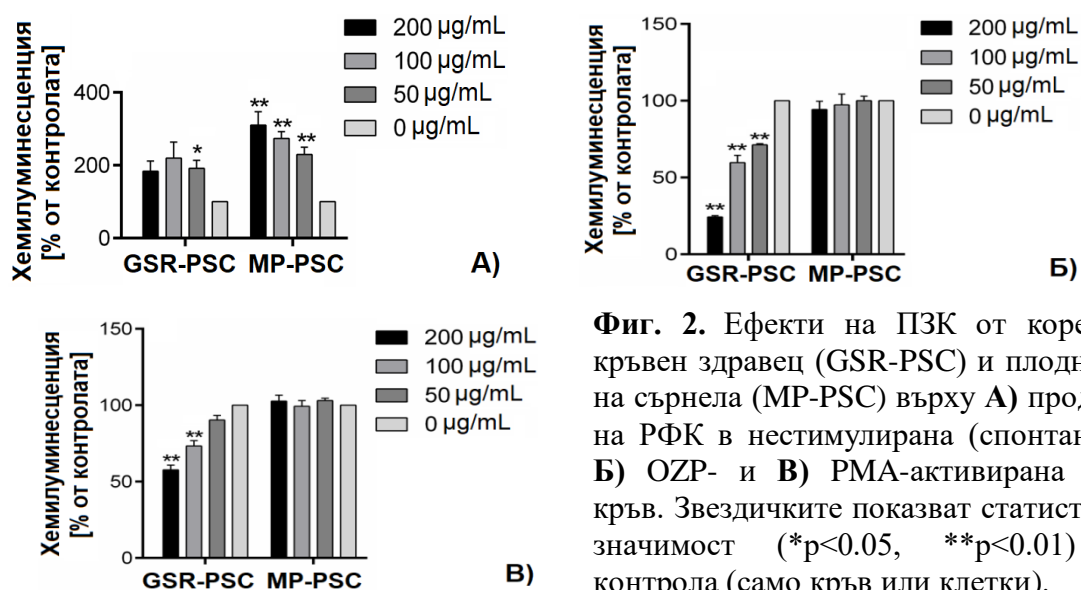
^aОпределен по метода на Брадфорд.

В комплексите бяха намерени и някои невъглехидратни съединения (**Табл. 2**). Общото съдържание на феноли в пробите беше ниско и варираше между 1.0% и 4.4%. Съдържанието на флавоноиди в GSL-PSC, GSR-PSC и MP-PSC беше 4.1, 1.0 и 2.6 mg/100 g, съответно. Определянето на общите флавоноиди беше направено по метода на Chang et al. (2002). След като беше установено затруднение с определянето на белтъка в ПЗК от бактериите по метода на Брадфорд, беше решено да се провери приложността на метода при пробите от здравеца и сърнелата. За целта бяха сравнени резултатите с данните получени от анализа по метода на Kjeldahl от първия етап. При сравнителния анализ беше намерено, че резултатите за съдържанието на белтък, определен по методите на Kjeldahl и Bradford, значително се различават само за GSL-PSC. При метода на Bradford беше определено, че комплексът съдържа 0.6% белтък и 12.2% по метода на Kjeldahl. За да се обясни наблюдаваната сериозна разлика е необходимо да се проведе анализ на аминокиселинния състав. Белтъчното съдържание при GSR-PSC беше 2.8% по Bradford и 1.9% по Kjeldahl, а за MP-PSC разликите бяха 12.7% по Bradford срещу 17.5%. Имайки предвид, че методът на Kjeldahl се повлиява от по-малко съединения с небелтъчна природа, в сравнение с този на Bradford, то той би следвало да бъде по-надежден. Най-същественият недостатък на метода на Kjeldahl е голямото количество проба за анализ.

2.2. Оценяване на *ex vivo* активирането на човешки неутрофили от избрани ПЗК чрез продукцията на РФК

За да се проверят стимулиращите ефекти на GSR-PSC и MP-PSC върху клетки на вродения имунитет беше изследвана продукцията на РФК в човешка кръв (**фиг. 2**). Анализите бяха проведени на луцинометър (Orion II Berthold Detection Systems), съгласно Georgiev et al. (2017a). На базата на резултатите от образуването на биофилм от пробиотични МКБ, третирани с GSL-PSC, GSR-PSC и MP-PSC (**т. 2.4.**), бяха избрани за анализ GSR-

PSC и MP-PSC. ПЗ-те влизат в контакт едновременно с имунокомпетентните епителни клетки и полезните бактерии в СЧТ, като по този начин може да се постигне активиране на имунната система и подобряване на имунитета (Georgiev et al., 2018). Избраните проби съдържат ПЗ, които се отличават съществено по химичния си състав и структура, което е изключително важно при търсенето на ефективни антигенни епитопи при сложните въглехидрати. За провеждането на анализа бяха използвани различни донори на кръв от тези при извършването на флоуцитометричните изследвания с човешки левкоцити, третирани с ПЗК, през първия етап на проекта. Това беше направено с цел да се увеличи броят на тестваните кръвни проби, за да се провери дали ще се запазят наблюдаваните ефекти от флоуцитометричния анализ.



Фиг. 2. Ефекти на ПЗК от корените на кръвен здравец (GSR-PSC) и плодните тела на сърнела (MP-PSC) върху А) продукцията на РФК в нестимулирана (спонтанен път), Б) OZP- и В) PMA-активирана човешка кръв. Звездичките показват статистическата значимост (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) срещу контрола (само кръв или клетки).

GSR-PSC и MP-PSC стимулираха спонтанното образуване на РФК в човешка кръв при изследваните концентрации (фиг. 2А). При MP-PSC беше постигната статистически значима дозозависима активност ($p < 0.01$). Наблюдаваните ефекти за двете проби бяха в съответствие с резултатите за активиране на CD14+ моноцитите и гранулоцитите от анализите през първия етап. Неутрофилите се разглеждат като основните клетки, които са отговорни за продукцията на РФК в кръвна среда (Barnes et al., 2012). Ето защо беше предположено, че ПЗК биха могли да активират именно тях. Добре е известно, че производството на РФК от NADPH оксидазата в неутрофилите, в условия на инфекция, има важна роля в имунната защита и в създаването на оксидативен стрес.

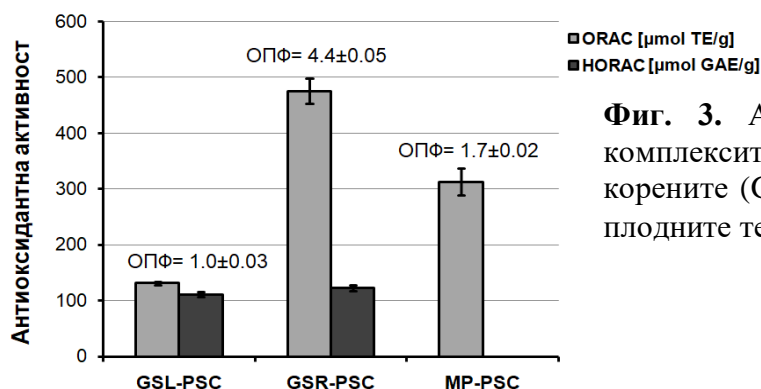
Допълнително, GSR-PSC прояви ясен дозозависим и статистически значим ($p < 0.01$) потискащ ефект върху OZP-предизвиканата продукция на РФК в кръвта (фиг. 2Б). Сходен дозозависим инхибиращ ефект беше открит и при PMA-активираната продукция на РФК в човешка кръв (фиг. 2В). MP-PSC не понижи образуването на РФК при костимулиране с OZP или PMA. OZP и PMA бяха използвани като доказани възпалителни агенти с цел симулиране на стерилна микробиална инфекция и изследване на *ex vivo* терапевтичните ефекти на двата ПЗК. GSR-PSC проявяваше едновременно стимулиращ ефект върху кръвните фагоцити и противовъзпалително действие в условия на инфекция, а MP-PSC само стимулиращо действие. Приносът на невъглехидратните компоненти в GSR-PSC (23.2%) и MP-PSC (25.9%) върху производството на РФК и

другите биологични ефекти не може да бъде изключен. В точка **2.3.** по-долу са изследвани антиоксидантните способности на ПЗК, тъй като те могат да повлияят върху продукцията на РФК и наблюдаваните *in vitro* противовъзпалителни ефекти от GSR-PSC. Разликата в ефектите на двата комплекса най-вероятно се дължеше на съдържанието на структурно различни ПЗ в тях. В GSR-PSC наред с нишестето се съдържаха пектини, като в предходни наши изследвания с други пектини беше открит сходен двойствен ефект и другите пектини бяха също способни да активират неутрофили, макрофаги и Т клетки (Georgiev et al., 2017a, b, c). МР-PSC съдържаше смес от неутрални ПЗ, като гликоген, α/β -глюкани, глюкоманан и фукогалактан. Най-вероятно по-сложната структура и разнообразен монозахариден състав в GSR-PSC, заедно с молекулната маса на отделните фракции в пробата, са важни за проявление на противовъзпалително действие. Изясняването на молекулните механизми за потискане продукцията на РФК при костимулиране с РМА или ОЗР е от съществено значение за определяне на перспективите на приложение на GSR-PSC и неговите ПЗ.

Известно е, че РМА стимулира възпалителните процеси и туморогенезата, като молекулата е активатор на ензима протеин киназа С (PKC), свързан с активирането на MAP-киназия път и водещ до стимулирането на NADPH оксидазата да образува супероксидни аниони в неутрофилите (Karlsson et al., 2000). РМА действа като миметик на вторичния липиден посредник от клетъчните мембрани диацилглицерол, който повлиява PKC. Зимосанът се използва за симулиране на гъбична инфекция, тъй като се извлича от дрожди и се разпознава от различни повърхностни рецептори върху фагоцитите, като CR1/3, Fc γ , TLR2/6, Dectin-1 (Brungs et al., 2015). Зимосанът също може да активира NADPH оксидазата в неутрофилите с участието на белтъците p47phox, Rac2, протеин тирозин кинази, PI3 киназа, p38MAPK, ERK1/2 и PKC (Makni-Maalej et al., 2013). В проекта сме използвали зимосан, който е бил предварително опсонизиран чрез имуноглобулини и комплементни фактори, което предполага неговото разпознаване, поглъщане от фагоцитите и последващо разграждане във фаголизозомите. Ето защо беше хипотезирано, че GSR-PSC активира системата на комплемента в тестваната кръв, сходно на ОЗР. В заключение може да се допусне, че ПЗ-те в GSR-PSC взаимодействат с РМА и ОЗР, съревновават се с тях за рецепторното разпознаване или активират сигнална трансдукция, която води до повишение на техния възпалителен отговор. За изясняване на точните механизми на понижаваната продукция на РФК са необходими по-задълбочени изследвания в условия на костимулиране с GSR-PSC и ОЗР/РМА.

2.3. Антиоксидантна активност на ПЗК от кръвен здравец и сърнела

Общото съдържание на въглехидрати в пробите варираше в тесни граници от 73.6-76.8%. Това показва, че всеки един от комплексите съдържа и невъглехидратни съединения, които могат да допринесат или най-общо да повлияят върху намерените имуномодулиращи ефекти (виж т. **2.2.**) и биофилм-стимулиращи (виж т. **2.4.**) свойства при лактобацили. За да се оцени влиянието на невъглехидратните съединения върху образуването на биофилм от пробиотични и патогенни бактерии се изисква първо изолиране на въпросните съединения от комплексите. Това не представляваше интерес за настоящия проект. От друга страна, влиянието на антиоксидантните съединения в пробите върху синтеза на РФК от човешка кръв може да бъде оценено индиректно чрез изследване на антиоксидантната активност на самите проби. Следователно беше изследвана тази активност на комплексите от *G. sanguineum* и *M. procera*, като резултатите от анализите са представени на **фиг. 3**.



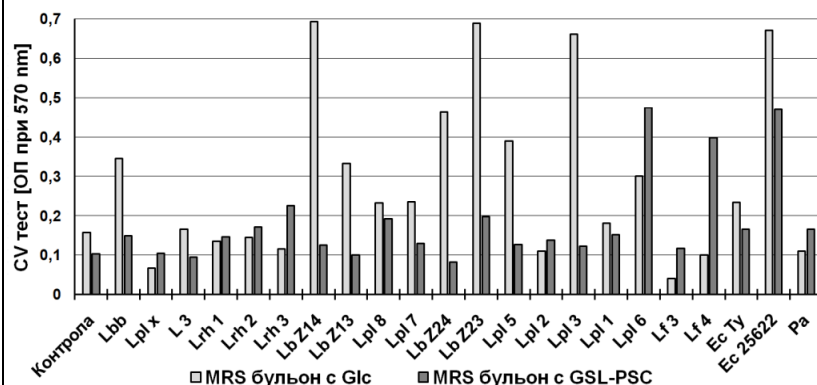
Фиг. 3. Антиоксидантна активност на комплексите от листата (GSL-PSC) и корените (GSR-PSC) на кръвен здравец, и плодните тела на сърнела (MP-PSC).

От данни по ORAC метода се вижда, че трите ПЗК се характеризираха със сравнително ниска антиоксидантна активност. Анализът беше проведен по метода на Ou et al. (2001), с модификация на Denev et al. (2010) на спектрофлуориметър FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech). Резултатите бяха представени като TE/g. GSR-PSC ($475.8 \pm 22.6 \mu\text{mol TE/g}$) се откри с най-висока активност, последван от MP-PSC ($313.3 \pm 13.9 \mu\text{mol TE/g}$). Съдържанието на общи феноли и флавоноиди в пробите беше също ниско (Табл. 2). Наблюдаваната активност по ORAC метода беше в съответствие със съдържанието на общи феноли в комплексите. Всичко това показва, че антиоксидантите в GSR-PSC и MP-PSC нямат съществена роля в наблюдаваните ефекти при третирането на кръвни фагоцити с тях, и отчетеното понижение в образуването на РФК при костимулиране с GSR-PSC и OZP или PMA (фиг. 2). Следователно *in vitro* противовъзпалителното действие на GSR-PSC се дължеше преди всичко на ПЗ-те в комплекса. Това твърдение ще бъде проверено след изследване на пречистените ПЗ (т. 2.5.). Само пробите от *G. sanguineum* проявиха активност по HORAC метода. Активността на GSR-PSC и GSL-PSC беше сходна, но ниска (фиг. 3). Анализът беше проведен съгласно Ou et al. (2002), при използване на стандарт галова киселина. MP-PSC най-вероятно не показва активност по HORAC метода, тъй като съдържанието на УК, които биха проявили метал-хелатиращи свойства, беше много ниско в тази проба. От друга страна пектините в кръвния здравец проявиха ниска HORAC активност, вероятно защото бяха високометоксилирани.

2.4. Ефекти на комплексите от кръвен здравец и сърнела върху образуването на биофилм от пробиотични и патогенни бактерии

При първия експеримент беше тествана пребиотичната способност на трите проби (2%, w/v) върху 19 пробиотични щамове от МКБ, изолирани от българско кисело мляко, катък, различни сирена (вкл. зелено сирене), други млечни продукти и хора. Допълнително беше изследвана инхибиращата способност на ПЗК върху 2 патогенни щамове от *E. coli* и 1 от *Pseudomonas aeruginosa*. Тестовите бяха проведени в *in vitro* моделна система с клетки (1×10^6 клетки/ямка), които бяха в експоненциална фаза на растеж (след 20 h). За целта беше използвана модифицирана (без въглерод-съдържащи съставки) MRS хранителна среда, в която като единствен въглероден източник присъстваха ПЗК. Преди инкубирането клетките бяха добре промити с физиологичен разтвор и растежът им се следеше до 96 h с индикаторно багрило бромкрезол пурпур (Tropcheva et al., 2013). За положителна контрола беше използвана Glc. Резултатите показваха, че 19-те щамове МКБ и патогените не могат да усвояват комплексите след 96 h на култивиране при изследваните условия (не е показано). Това най-вероятно се дължеше на сложните по състав и строеж ПЗ в пробите, за чието асимилиране се

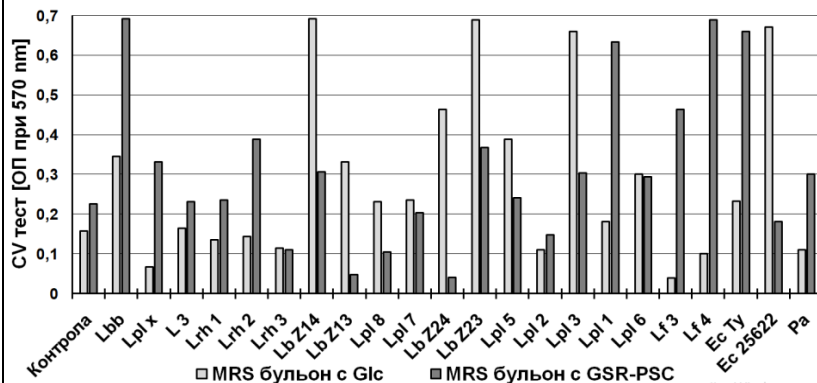
изискват по-богати катаболитни възможности. По принцип е известно, че по-просто устроените гликани, като скорбяла и инулин проявяват по-добри пребиотични свойства, в сравнение с нативните пектини (Wang et al., 2020). С помощта на ензимни модификации, обаче, е възможно да се получат пектинови олигозахариди, които могат да стимулират растежа на редица ценни лактобацили (Gullón et al., 2013).



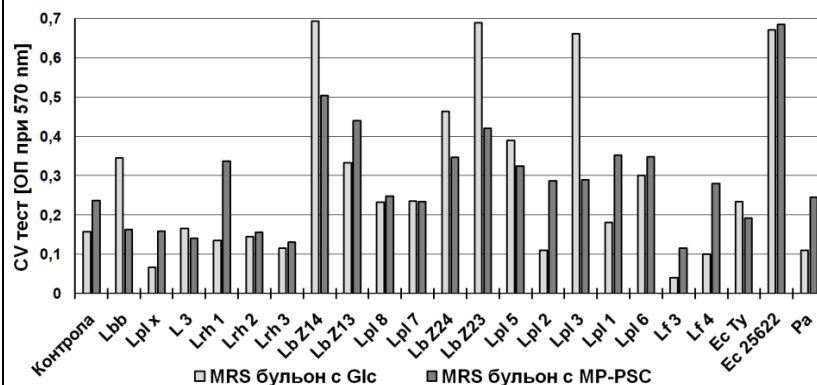
Фиг. 4. *In vitro* оценяване на образуването на биофилм от млечнокисели и патогенни (Ec Ty, Ec 25622 и Pa) бактерии, третирани с GSL-PSC или Glc (2%, w/v) за 96 h при 37°C. Контрола (без клетки).

Въпреки че комплексите не проявяваха пребиотична активност върху МКБ ние се натъкнахме на друго не по-малко важно тяхно свойство. При пробите беше наблюдавано щамово-специфично стимулиране на образуването на биофилм от някои от тестваните култури. Биофилм-формиращата активност беше изследвана при концентрация 1×10^6 клетки/ямка по метода с кристал виолет (CV тест) при 570 nm (Vacheva et al., 2012) на SPEKTROstar Nano-UV-Vis (BMG Labtech). Умерено образуване на биофилм ($2 \times \text{ОП}_{\text{контрола}} < \text{ОП}_{\text{проба}} \leq 4 \times \text{ОП}_{\text{контрола}}$) при култивиране на лактобацилите с GSL-PSC беше установено при Lrh 3 (*L. rhamnosus*), Lpl 6 (*L. plantarum*) и Lf 2 (*L. fermentum*) щамове или това прави 15.8% от тестваните пробиотици (фиг. 4). Могат да бъдат споменати също щамове Lpl 8 и Lb Z23 като слабо образувачи биофилм ($\text{ОП}_{\text{проба}} \leq 2 \times \text{ОП}_{\text{контрола}}$) при третиране с пробата. GSL-PSC потисна образуването на биофилм при двете тествани култури на *E. coli*, като щамът Ec Ty е клиничен изолат от възрастна жена с повтарящи се инфекции в уринарния тракт. Подобен ефект не беше наблюдаван при *P. aeruginosa* (Pa). Стимулирането на биофилмообразуването при пробиотиците е полезно за тяхното оцеляване при стресови условия в СЧТ и за тапициране на чревния епител с полезни бактерии, които могат да комуникират с интестиналната имунна система. Потискането на формирането на биофилми от патогени в червата с различни природни продукти предполага защитно действие, като потенциалът на билковите и гъбните ПЗ в това действие все още не е разкрит.

На фиг. 5 са представени резултатите за формиране на биофилм под действието на GSR-PSC. Пробата предизвика умереното формиране на биофилм от известната българска бактерия *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Сходна активност беше постигната при щамове Lpl 1, Lf 1 и 2, и беше изчислено, че умерена активност се наблюдава при 31.6% от МКБ. Слабо образуване на биофилм се детектира при щамове Lbr x и Lrh 2. GSR-PSC се открие като пробата, която повлия биофилмообразуването при най-много МКБ. Значително инхибиращо действие на формирането на биофилм беше намерено само при Ec 25622, а при другите 2 патогена беше наблюдаван обратен ефект. Това доказва, че активността на ПЗК е щамово-, а не видово-специфична.



Фиг. 5. *In vitro* оценяване на образуването на биофилм от млечнокисели и патогенни (Ec Ty, Ec 25622 и Pa) бактерии, третирани с GSR-PSC или Glc (2%, w/v) за 96 h при 37°C. Контрола (без клетки).

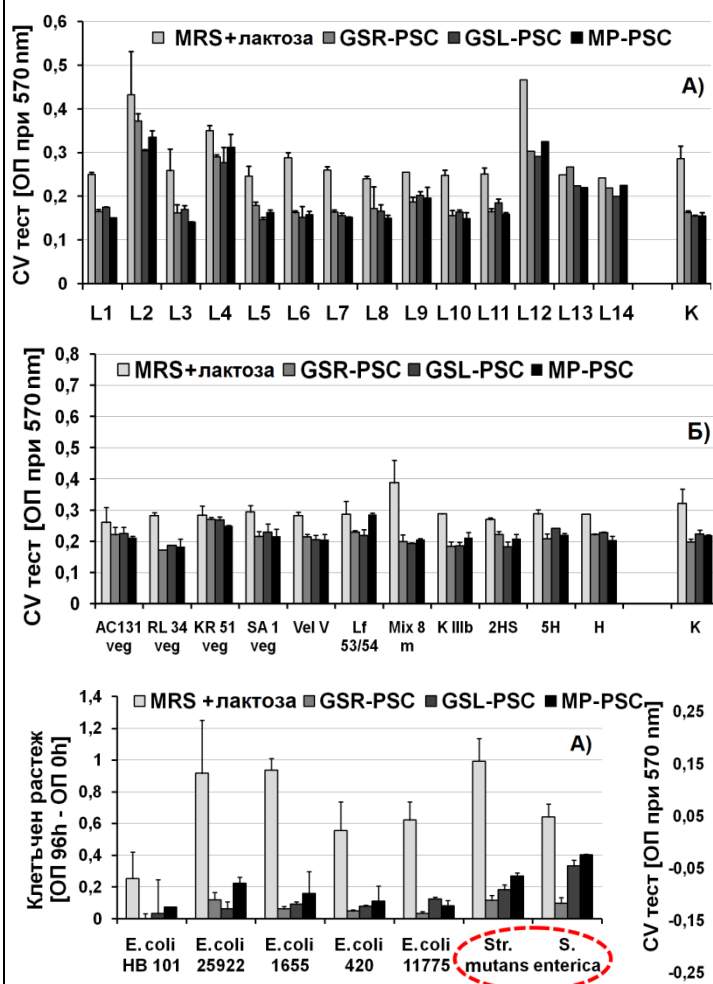


Фиг. 6. *In vitro* оценяване на образуването на биофилм от млечнокисели и патогенни (Ec Ty, Ec 25622 и Pa) бактерии, третирани с MP-PSC или Glc (2%, w/v) за 96 h при 37°C. Контрола (без клетки).

ПЗК от гъбата стимулира слабото образуване на биофилм при щамове Lrh 1, Lb Z13, Lpl 2, Lpl 1 и Lf 2 (фиг. 6), което прави 26.3% от тестваните пробиотици. При патогените с MP-PSC не беше постигнат потискащ ефект върху биофилмообразуването при изследваните условия. При MP-PSC и GSR-PSC бяха получени малко по-добри резултати от тези при GSL-PSC вероятно поради наличието на нишесте/гликоген в тях.

При втория експеримент бяха подбрани 14 щамове МКБ, изолирани от катък (L1 до L14) и 11 щамове от други млечни продукти и човешка кърма. Тези 25 култури не бяха изследвани в първия експеримент и бяха включени, за да се увеличи броят на скринираните МКБ в търсенето на пребиотични свойства и ефекти на пробите върху биофилмообразуването от МКБ. Бактериалният растеж, в присъствие на комплексите (2%, w/v), се следеше количествено в динамика от 0 до 96 h, като положителна контрола служеше лактоза. Новите култури също не можеха да се развиват в среда с ПЗК (не е показано). Допълнително беше проведено двукратно пре-култивиране на МКБ във веганска среда veg MRS с цел опит за индуциране на синтеза на някои хидролази, с които да стане възможно усвояването на ПЗК. Освен това беше използвано и високо микробно число (10^9 CFU/mL), за да се симулират условията на здрав стомашно-чревен тракт, с доминиране на добрите бактерии над лошите. При тези условия отново не се наблюдаваше растеж (не е показано). Щамове минаваха в режим на гладуване, като те не губеха виталност, но не се увеличаваше клетъчната популация. Затова отново проверихме способността им да формират биофилми в тези лимитиращи условия, при отсъствието на усвояем въглероден източник. На фиг. 7А са представени резултатите от третирането на МКБ, изолирани от катък. Трите ПЗК не стимулираха биофилм-формирането. Гладуващите клетки от изпитаните кандидат-пробиотици, въпреки високото микробно число и вероятната quorum sensing комуникация, не отключват

механизмите на формиране на защитен биофилм. По принцип щамове L2, L12 и L4 са умерено до силно биофилм-формиращи. Подобен ефект се наблюдаваше и при останалите МКБ, изолирани от други млечни продукти и хора (фиг. 7Б).



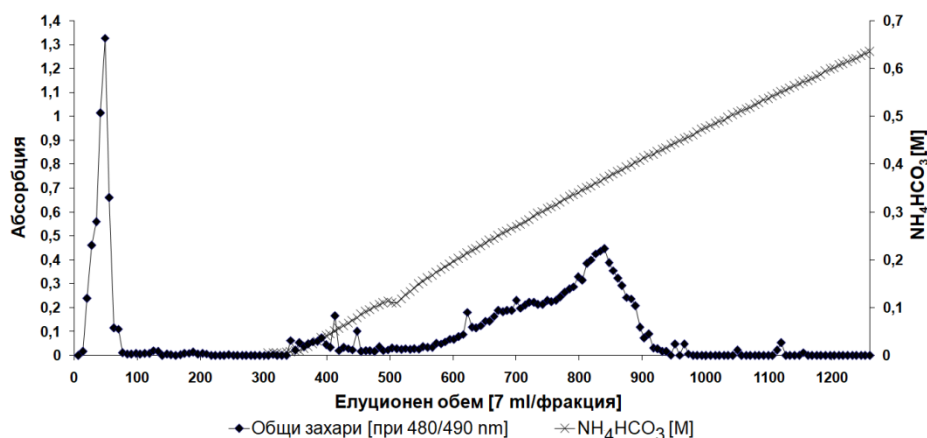
Фиг. 8. *In vitro* повлияване на растежа (А) и образуването на биофилм (Б)) от клинични и референтни патогенни щамове, третиран с трите ПЗК или лактоза (2% w/v) за 96 h при 37°C.

При нито един от лактобацилите не се откри статистически достоверно намаляване на отчетените биофилми, което означава, че ПЗК не повлияват негативно този процес. Ето защо беше хипотезирано, че в условията на здрав СЧТ, когато количествено МКБ доминират, добавянето на ПЗК би ограничило само патогените. Затова бяха проведени изследвания и с няколко патогенни щам на *E. coli*, 1 щам от *Str. mutans* и 1 от *S. enterica* serovar Thiphymurium. При щамове на *E. coli* по-скоро нямаше растеж, но при културите от другите два патогена беше открит слаб растеж при третиране с ПЗК (фиг. 8А). По-важен и практически значим беше ефектът на потискане на формирането на биофилм при всички патогени (фиг. 8Б). Това е биологически значим ефект, тъй като усилено се търсят средства за борба със салмонелните и др. инфекции.

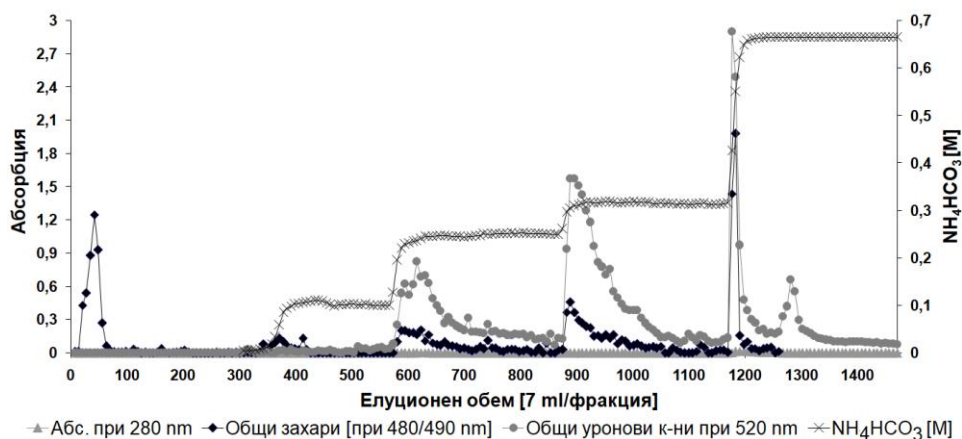
Фиг. 7. *In vitro* оценяване на образуването на биофилм от щамове, изолирани от катък (А) или други млечни продукти и хора (Б)), и третиран с трите ПЗК или лактоза (2%, w/v) за 96 h при 37°C. К (контрола без клетки).

2.5. Хроматографско пречистване и разделяне на ПЗ-те в GSR-PSC

GSR-PSC беше подложен на пречистване и разделяне чрез анионобменна хроматография, с използване на неподвижна фаза от DEAE-Sepharose CL-6B и елуенти дест. вода, и водни разтвори на NH_4HCO_3 , с различни моларни концентрации. Анализите бяха извършени на FPLC система BioLogic® LP (BioRad). При проведените предварителни експерименти в режим на линеен градиент 0-1 М NH_4HCO_3 (фиг. 9) бяха определени подходящите условия за пречистване на ПЗ-те (фиг. 10). При възприетите условия за анализ на ПЗ-те бяха получени 1 неутрална и 5 кисели фракции. С цел натрупване на нужните количества пречистени ПЗ за провеждане на последващите химични и биологични анализи бяха извършени 8 препаративни анализа. В края на всеки анализ бяха получени по 210 фракционни епруветки, като елуционният профил на анализирания ПЗ беше визуализиран чрез определяне на общите захари (Dubois et al., 1956) и общите УК (Thibault, 1979) във всички фракционни епруветки. Поради хетерогенността на пробата се налагаше мониторинг на профила след всеки анализ.



Фиг. 9. Предварителен анализ за хроматографско пречистване и разделяне на GSR-PSC на колона DEAE-Sepharose CL-6B (1.5×50 cm) в линеен режим на елуиране (1 mL/min) с 0-1 М NH_4HCO_3 . Пробата (150 mg) е разтворена в дест. вода (7.5 mL).



Фиг. 10. Хроматографиране на GSR-PSC на колона DEAE-Sepharose CL-6B (1.5×50 cm) в стъпаловиден режим на елуиране (1 mL/min) с 1) 300 mL H_2O , 2) 200 mL 0.1 М NH_4HCO_3 , 3) 300 mL 0.3 М NH_4HCO_3 , 4) 300 mL 0.4 М NH_4HCO_3 и 5) 370 mL 1 М NH_4HCO_3 . Пробата (150 mg) е разтворена в дест. вода (7.5 mL).

Изводи/Обобщение

В настоящия проект беше установено, че кръвния здравец, сърнелата и цианобактериите *A. laxa*, *O. limosa* и *P. molle* са нови източници на кисели и неутрални ПЗ с имуномодулиращо действие. В резултат на химичните изследвания, през втория етап на проекта, беше установено, че невъгледхидратните съединения в комплексите от цианобактериите заемат между 36.5% (PM-PSC) и 47% (AL-PSC), а при пробите от билката и гъбата между 25.9% (MP-PSC) и 23.2% (GSR-PSC).

Биологичните изследвания през този етап бяха фокусирани върху комплексите от кръвния здравец и сърнелата. GSR-PSC и MP-PSC активираха *ex vivo* продукцията на РФК от човешки кръвни фагоцити, което допълни и потвърди по биохимичен път наблюдаваните имуностимулиращи ефекти на пробите от първия етап на проекта. За разлика от MP-PSC, GSR-PSC потисна стимулираната продукция на РФК от кръвни фагоцити, в условия на стерилна инфекция с възпалителните агенти OZP и PMA. Това показва двойствената активност или противовъзпалителния потенциал на комплекса. Неговото съдържание на ПЗ беше 76.8%, от които 20.1% се падаха на нишестето и 18% на полиуронидите от пектина. Ниското съдържание на общи феноли и флавоноиди в GSR-PSC, както и ниската антиоксидантна активност по ORAC и HORAC методите, доказаха несъщественото влияние на антиоксидантите върху противовъзпалителното му действие. Следователно може да се предположи, че ПЗ-те в корените на кръвния здравец са поне частично отговорни за наблюдаваните в етнофармакологията противовъзпалителни ефекти на екстракти от тях. Нещо повече, може да се допусне, че именно пектините са били свързани с проявения двойствен ефект от GSR-PSC върху фагоцитите, тъй като MP-PSC не прояви подобно действие и не съдържаше пектини. Това ще бъде проверено при реализиране на трети етап на проекта чрез провеждане на имунологични изследвания с вече пречистените от втория етап ПЗ.

В оценяването на биологичната активност на ПЗК от кръвен здравец и сърнела беше открито, че наред с имуностимулиращата и противовъзпалителната им активности, те притежават и полезни ефекти върху кандидат-пробиотични лактобацили, изолирани от кисело мляко, сирена, кашкавал, катък, извара и човешка кърма. Въпреки, че ПЗК не стимулираха *in vitro* растежа във всички 44 тествани щама, пробите увеличиха образуването на полезен биофилм при някои от тях. GSL-PSC, MP-PSC и GSR-PSC (2%, w/v) се характеризираха със слаба или умерена биофилм-образуваща способност при 11.4%, 11.4% и 13.6% от 44-те щамове. Допълнително беше открито, че пробите (2%, w/v) потискат биофилм-формирането при патогенни и референтни щамове на *E. coli*, *Str. mutans* и *S. enterica*. Евентуалната противовъзпалителна активност на GSR-PSC и избирателното му действие при биофилм-формирането от полезни и болестотворни бактерии разкриват потенциала на комплекса и неговите ПЗ за подпомагане третирането на възпаления и инфекции в СЧТ. Необходими са допълнителни *ex vivo* и *in vivo* изследвания с подходящи експериментални модели за доказване на приложението на ПЗ-те от корените на кръвния здравец във функционалното, диетично хранене на човека и биомедицината. Наблюдаваните полезни ефекти на GSL-PSC и MP-PSC също заслужават внимание, затова е планирано хроматографско фракциониране, химично охарактеризиране и оценка на биологичната активност на получените пречистени фракции при реализиране на трети етап на проекта (виж Приложение 9).

Публикации (излезли или подадени за печат публикации, в които изрично е изказана благодарност към Програмата) и участия на научни форуми

През втория етап на постдокторантския проект са подготвени две експериментални статии:

Подадени публикации:

1. Yordan N. Georgiev, Tsvetelina G. Batsalova, Balik M. Dzhambazov, Manol H. Ognyanov, Petko N. Denev, Daniela V. Antonova, Christian W. Wold, Irina Z. Yanakieva, Ivanka I. Teneva, Berit S. Paulsen and Svetlana D. Simova. Immunomodulating polysaccharide complexes and antioxidant metabolites from *Anabaena laxa*, *Oscillatoria limosa* and *Phormidesmis molle*. Ръкописът представлява експериментална статия, която е подадена на 30.11.2020 г. в научно списание Algal Research (ИФ=4,008 за 2019 г., Q1 за „Agronomy and Crop Science“ по данни на Scopus от 2019 г.) на издателство Elsevier. Ръкописът се рецензира от 11.01.2021 г. Той е представен в **Приложение 1**.

Подготвени публикации за подаване:

1. Yordan N. Georgiev, Tsvetelina G. Batsalova, Balik M. Dzhambazov, Lili I. Dobрева, Manol H. Ognyanov, Petko N. Denev, Svetla T. Danova, Svetlana D. Simova, Ondrej Vasicek, Christian W. Wold, Berit S. Paulsen, Albert I. Krastanov. Acidic and neutral polysaccharide complexes from *Geranium sanguineum* L. and *Macrolepiota procera* (Scop.) Sanger stimulate human leukocytes and probiotic biofilm formation. Ръкописът представлява експериментална статия, която е подготвена за подаване в научно списание International Journal of Biological Macromolecules (ИФ=5,162 за 2019 г., Q1 за Medicine (miscellaneous) и Energy (miscellaneous) по данни на Scopus от 2019 г.) на издателство Elsevier и ще бъде подаден до края на февруари 2021 г. В момента предстои последно обсъждане на статията от всички съавтори, преди подаване в списанието. Ръкописът е представен в **Приложение 2**.

Постдокторантският проект е представен с устни доклади на следните научни форуми в страната и чужбина:

Международни научни конференции:

1. Yordan N. Georgiev, Berit S. Paulsen, Ondrej Vasicek and Balik M. Dzhambazov. Keynote lecture: In search of natural heteroglycans acting as valuable immunogenic mimetics with future applications in the human health care. 16th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience, 5th November 2020, Prague, Czech Republic. Конференцията беше организирана от Чешкото химическо дружество и Университет по химия и технология в гр. Прага. Резюме на доклада е представено в **Приложение 3**. Допълнително, в папка "Prezentacii" е включен и самият доклад. В резултат на участието на конференцията беше получена покана за научно сътрудничество и подготвяне на съвместен международен проект, в рамките на ЕС, с групата на проф. д-р Jana Šoríková, Department of Carbohydrates and Cereals, Университет по химия и технология, гр Прага, Чехия (**Приложение 3а**).
2. Yordan N. Georgiev, Tsvetelina G. Batsalova, Lili I. Dobрева, Balik M. Dzhambazov, Manol H. Ognyanov, Petko N. Denev, Svetla T. Danova, Svetlana D. Simova. Biologically active acidic and neutral heteropolysaccharides from *Geranium sanguineum* L. and

Macrolepiota procera (Scop.) Singer. International Symposium on Bioinformatics and Biomedicine 8th 10th October 2020, Burgas, Bulgaria. Конференцията беше организирана от Университет „Проф. д-р Асен Златаров“ – Бургас, Институт по биофизика и биомедицинско инженерство към БАН, УМБАЛСМ "Н. И. Пирогов" гр. София и Съюз на учените в България. Резюмето на доклада е представено в **Приложение 4**. Допълнително, в папка "Prezentacii" е включен и самият доклад. При участието на конференцията беше спечелена награда за най-добър устен доклад на млад учен.

Благодарение на проекта беше финансирано и участието с доклад за представяне на непубликувани резултати от дисертацията на постдокторанта на следната научна конференция:

3. Йордан Н. Георгиев, Манол Хр. Огнянов, Веселин К. Късовски, Даниела В. Антонова, Мария Г. Крачанова, Петко Н. Денев, Анелия В. Биволарска. Изследване на комплемент-фиксиращите съединения в имунологично активни полизахаридни комплекси от традиционни лечебни растения. Юбилейна научна конференция с международно участие „Медицина на бъдещето“, 29-ти – 31-ви октомври, 2020 г., гр. Пловдив. Конференцията беше организирана по повод на 75 годишнината от основаването на Медицински университет – Пловдив. Резюмето на доклада беше публикувано на английски език в научно списание Folia Medica, [62(Suppl. 1), 2020, 46] и е представено в **Приложение 5**. Допълнително, в папка "Prezentacii" е включен и самият доклад.

Подготвяне на международен научен проект:

В резултат на участието на постдокторанта, с доклад по резултати от проекта, на специализираната конференция 15th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience през 2019 г. в гр. Прага беше установено научно сътрудничество с групата на проф. д-р Юрий Скорик от Институт по високомолекулни съединения към Руската академия на науките в гр. Санкт Петербург. Двете групи подготвихме съвместно проектно предложение на тема „Изследване на структурата и възможностите за приложение в биомедицината на полизахаридите от лечебното растение *Bistorta major* Gray (кървавиче)“ в „Конкурс за проекти по програми за двустранно сътрудничество - България - Русия – 2019-2020 г.“ към Фонд „Научни изследвания“ и Руската фондация за фундаментални изследвания. Анотацията на проекта и резултатите от конкурса са включени в **Приложение 6**. Подготвеният от българския колектив проект получи 99.5% от рецензирането в България, но не беше одобрен за финансиране от двустранната българо-руска комисия.

Популяризиране на проекта в обществото:

Подготовка на научно-популярна статия с автор Йордан Георгиев и със заглавие: Лечебните растения съдържат имунологично активни полизахариди с противовъзпалителен потенциал, която ще бъде подадена в списание „Природа“ на БАН в рамките на месец февруари 2021 г. Ръкописът е представен в **Приложение 7**.

Представяне на проекта в интервю по покана от списание Bglobal (<https://bglobal.bg/>), чието публикуване предстои скоро.

Използваната литература може да бъде намерена в **Приложение 8**. В **Приложение 9** е представена Работна програма при реализиране на трети етап по постдокторантския проект. Всички приложения към отчета са представени само в електронния вариант.

Дата: 04.02.2021 г.

гр. София

Изготвил: 

/гл. ас. д-р инж. Йордан Георгиев/