БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ШЕСТМЕСЕЧЕН НАУЧЕН ОТЧЕТ

НАЦИОНАЛНА НАУЧНА ПРОГРАМА
„ИНОВАТИВНИ НИСКОТОКСИЧНИ
БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ СРЕДСТВА ЗА
ПРЕЦИЗНА МЕДИЦИНА“

БиоАктивМед

РМС № 658 от 14.09.2018 г.
ДО1-217/30.11.2018 г. и ДО1-323/18.12.2019,
финансиран от МОН

Координатор: доц. д-р Оля Стоилова

София, юли 2020 г.

МЕЖДИНЕН НАУЧЕН ОТЧЕТ

от изпълнението на Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“

Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“ е одобрена с **РМС № 658 от 14.09.2018** и се изпълнява въз основа на подписани споразумения **ДО1-217/30.11.2018** и **ДО1-323/18.12.2019** между Министерството на образованието и науката (МОН) и Българската академия на науките (БАН). **Целта** на провежданите научни изследвания, финансирани по Програмата е **разработване на нови нискотоксични биологично активни средства и системи, съдържащи екстракти от природни източници (с растителни или животински произход) от България за превенция и подпомагане на терапията на някои заболявания**. Провежданите в ННП БиоАктивМед изследвания са в съответствие с трите основни стълба на рамковата програма на ЕС за научни изследвания и иновации „Хоризонт 2020“ – *Бъдещи и навлизащи технологии*, *Водещи технологии в индустрията* и *Обществени предизвикателства*. Изследванията са и в съответствие с приоритетните направления *Здравеопазване, демографски промени и благополучие* на Националната стратегия за развитие на научните изследвания в Република България 2017-2030 г., както и с *Биотехнологии за здравословен начин на живот и Информационни и комуникационни технологии (IT подходи в медицината)* на Иновационна стратегия за интелигентна специализация на Република България 2014-2020 г. Нещо повече, Програмата има пряко отношение и е в синергизъм с поставените цели и задачи на два от Центровете по компетентност – „*Устойчиво оползотворяване на био-ресурси и отпадъци от лечебни и ароматични растения за иновативни биоактивни продукти*“ (BG05M2OP001-1.002) и „*Чисти технологии за устойчива околна среда – води, отпадъци, енергия за кръгова икономика*“ (BG05M2OP001-1.002-0019).

Изпълнението на първи етап от втората година продължи с провеждането на насочени фундаментални изследвания за изолиране и пречистване на биологично активни вещества (БАВ) от растителен и животински произход, влагането им индивидуално или като нови иновативни средства или системи и създаването на нови методологии за тяхното изследване и определяне на качеството и приложимостта им като нови продукти за целите на персонализираната и превантивна медицина. Едно от планираните дългосрочни приложения е внедряване в практиката на новите иновативни

и безопасни здравословни хранителни добавки и козметични средства за локално приложение с превантивен потенциал за персонализирана медицина. По този начин ще се окаже и съдействие на здравната система за оптимизиране и намаляване на медицинските разходи при мултирезистентни инфекции.

В съответствие с работния план за втората година, работният колектив проведе изследвания и изпълни дейностите по посочените по-долу основни работни пакети:

Работен пакет 1 **Получаване на нови биологично активни средства/системи, съдържащи екстракти от природни източници (с растителни или животински произход) от България**

Ръководител на работния пакет**: проф. д-р Павлина Долашка**

Задача 1.1. Изолиране и охарактеризиране на БАВ от екстракти от растителен произход. Изпълнители: МУ-Пловдив, ИОХЦФ-БАН, ПУ, МУ-ФФ, ИМолБ-БАН

Семена от Ginkgo biloba (Гинко билоба)



През периода бяха направени нови анализи на биологично активни съединения в състава на семената. За определяне на протеиновото съдържание беше използван утвърдения от *American Oil Chemists Society* метод на Киелдал, а след екстракция с хексан беше изолирана липидната фракция, на която чрез хроматографски методи беше определен мастно-киселинния състав и съдържанието на токофероли. Съдържанието на протеини в суровите семена е около 5% (10% от сухото вещество). Съдържанието на глицеридно масло в семената на ***Гинко билоба*** е 1%, което е доста по-ниско в сравнение със съдържанието на мазнини в други видове ядки. Мастно-киселинният състав показа високо съдържание на ненаситени мастни киселини – 81%, а съдържанието на наситените мастни киселини е 19%. Еднакво е съотношението на моно- и полиненаситените мастни киселини, съответно 41% и 40%. От всички мастни киселини най-високо е съдържанието на линолова киселина – 32.2%. Тя е омега-6 ненаситена киселина и е една от есенциалните мастни киселини. Значително е съдържанието и на друга ненаситена киселина – олеиновата – 24.5%, следвана от ненаситената палмитинова киселина – 15%. Като цяло съдържанието на ненаситените ω-мастни киселини е 38.5%. Общото количество токофероли е 192.6 mg/100 g масло. Изследването на индивидуалния

токоферолов състав показа, че най-високо е процентното съдържание на γ- и α-токоферол, съответно 47% и 41%.

Продължи анализа на водно-метаноловите екстракти на нискомолекулни вторични метаболити от семена на ***Гинко билоба***. Количественият анализ на полифенолни киселини чрез високоефективна течна хроматография показа наличие само на кумарова киселина (478 µg/g сухо вещество); не бяха открити галова, 3,4-дихидроксибензоена, хлорогенова, ванилинова, кафеена, сирингова, синанова, ферулова и канелена киселини. Проведените анализи за общо съдържание на въглехидрати и водоразтворими танини във водно-метаноловите екстракти показаха наличието на 375 mg еквиваленти глюкоза/g сухо вещество и 9.2 mg еквиваленти танинова киселина/g сухо вещество.

Корени от брей (Tamus communis L)



Основна задача през отчетния период по отношение на този растителен източник беше да се направи възможно пълен скрининг на фитохимичния състав, за да се търсят съединения или компоненти, чрез които екстрактите да се стандартизират преди влагането им в полимерни системи за доставяне, за да може да бъде осигурена повторяемост при бъдещи биологични тестове. За целта бяха разработени три нови метода за определяне на танини, сапонини и въглехидрати. Получените резултати дават възможност да се придобие по-пълна представа за съдържанието на вторични метаболити в корените: полифеноли – 112.2 ± 2.2 GAE/g (mg галова киселина за g сухо вещество), в това число 3.8 ± 0.3 QE/g флавоноиди (mg еквиваленти кверцетин за g сухо вещество) и 13.3 ± 0.9 mg/g водоразтворими танини (mg танинова киселина за g сухо вещество), въглехидрати – 875.8 ± 12.01 mg/g (спрямо глюкоза като стандарт).

Един единствен литературен източник споменава за присъствие на фитостерола диосгенин в растението, който е известен със своя противовъзпалителен ефект. Това беше причина да се опитаме да го изолираме чрез екстракция с бутанол и следваща киселинна хидролиза. За сега анализът чрез тънкослойна хроматография не потвърждава наличие на диосгенин в корените от брей.

Антиоксидантните свойства на 70% метанолов екстракт от корени на брей са оценени чрез два метода. DPPH метода показва, че 0.78 ± 0.03 mg сухо вещество неутрализира 50% от наличния 100 µmol DPPH радикал (колкото по-малко е количеството на сухото вещество, толкова по-добри са радикал-свързващите свойства). Желязо-

редуциращият капацитет на екстракта, изразен в Тролокс еквиваленти (mg водоразтворим аналог на витамин Е) е 336.0 ± 4.44 mg/g.

Надземна част от ендемичен вид ранилист (Betonica Bulgarica)



Основна задача през периода беше по-доброто охарактеризиране и количествено определяне на компоненти в екстрактите с потенциален биологичен ефект. Общото полифенолно съдържание в екстрактите беше в интервала 344 - 448 mg/g сухо вещество, а съдържанието на флавоноиди беше в интервала 2.44 - 5.63 mg/g. Чрез високоефективна течна хроматография (ВЕТХ) с UV детектор беше определено съдържанието на три индивидуални флавоноида в екстракти от три популации от растението. Не беше установена статистически значима разлика между растенията, събрани от различните местонахождения.

Най-високо беше съдържанието на рутин – 1.84 - 4.94 mg/g, следвани от кверцитин – 0.94 - 2.79 и хиспидулин – 0.202 - 0.428 mg/g. Проблем при работата беше недостатъчния растителен материал, с който разполагаме, тъй като основните популации на растението са в Стара планина и то има статут на застрашен вид, което не позволява събиране на по-големи количества.

Изолиране и пречистване на индивидуални вторични метаболити от видове Gentiana (тинтява) и Thymus (мащерка)



През отчетния период продължиха изследванията върху проучване на химичния състав на видове **мащерка (*Thymus*)** и **тинтява (*Gentiana*)** от български произход и установяване на биологичната активност на индивидуални съединения, съдържащите ги фракции и екстракти. В това отношение продължиха изследванията на състава на фракции от метанолен екстракт на ***Thymus pulegioides***, получени от предходния етап, както и разработването на метанолен екстракт от ***Thymus sibthorpii***. От фракциите на ***T. pulegioides*** бяха изолирани още два флавоноидни гликозида, а фракционирането на екстракта от ***T. sibthorpii*** доказа, че състава на основните компоненти на този вид е същия като този на ***T. pulegioides***. И така изследванията продължиха в посока химично профилиране на метанолните

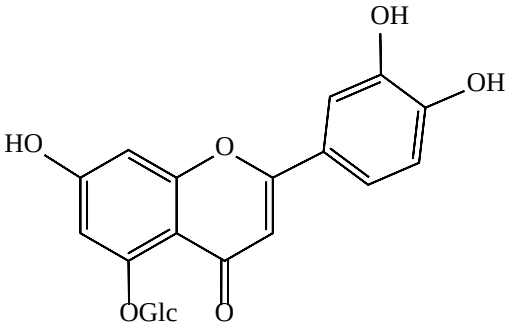


извлеци от трите растителни вида (***T. pulegioides***, ***T. sibthorpii*** и ***T. glaberescens***), подбрани за целите на Програмата, чрез използване на ВЕТХ-МС.

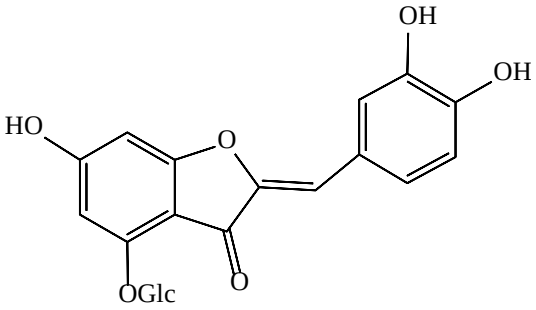
Продължи и проучването на екстракти на видовете ***Gentiana*** и сравнението на химичният им състав. Основната цел беше установяване на сходства и разлики в съдържанието на основните вторични метаболити, които са отговорни за биологичната активност на растенията и оценка на надеждността на предлагания в търговската мрежа растителен материал като суровина за потенциални фитопрепарати. За целта бяха получени метанолни екстракти от ***Gentiana cruciata*** (от естествено находище в планина Славянка) и ***Gentiana asclepiadea*** (от планините Витоша и Родопи). Тяхното фракциониране и изолиране на индивидуални компоненти доведе до идентифициране на още два иридоидни гликозида и един алкалоид, характерни за рода. Изолираните индивидуални съединения от предходен и настоящия етап бяха използвани за провеждането на химично профилиране на получените екстракти чрез ЯМР спектроскопия с цел да бъдат установени приликите и разликите в химичния им състав. Използван е следния растителен материал от видове ***Gentiana***: ***Gentiana cruciata*** от хижа Изгрев, Славянка, ***Gentiana asclepiadea*** от Витоша и ***Gentiana asclepiadea*** от Родопи.

Изолиране на индивидуални съединения от фракции на T. pulegioides

От фракция 7 (0.330 g) е идентифицирана една от получените фракции като ***аурезидин глюкозид*** (19.0 mg), известен и с тривиално наименование – ***цернуозид***, а от фракция 10 (0.300 g) е изолиран флавоноид, който е идентифициран като ***лутеолин-5-О-глюкозид*** (16.5 mg). Структурата на тези съединения е определена чрез 1D и 2D ЯМР спектроскопия.



лутеолин-5-*О*-глюкозид



аурезидин-4-*О*-глюкозид

Изолиране на индивидуални съединения от фракции на T. sibthorpii

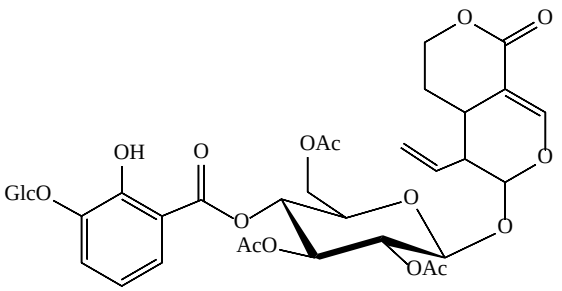
От сухия растителен материал от ***Thymus sibthorpii*** (81 g) са получени 9 груби фракции. От фракция 1 (1.9 g) е изолирана ***5'-глюкопиранозил жасмонова киселина*** (15

mg), а от фракция 6 (0.300 g) е идентифицирана ***розмаринова киселина*** (общо 52 mg) с различна степен на чистота.

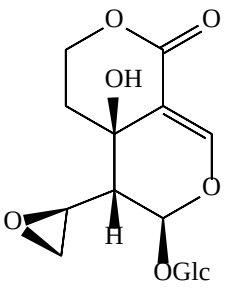
Химично профилиране на екстракти от видове Thymus

На получените метанолови екстракти от ***T. pulegioides***, ***T. sibthorpii*** и ***T. glaberescens*** е анализиран състава на основните фенолни компоненти чрез високо-ефективна течна хроматография и мас-спектрометрия (ВЕТХ-МС). Така бяха идентифицирани **12 индивидуални съединения**, от които две основни, съдържащи се и в трите екстракта са: глюкозид на жасмоновата киселина (**1**) и на розмариновата киселина (**10**). Съединение **9** – лутеолин-7-*O*-глюкуронид е идентифицирано в екстрактите от *T. pulegioides* и *T. sibthorpii*, но в този от *T. glabrescens* не се наблюдава. Други общи съединения и за трите екстракта са кверцетиновия гликозид **4**, кафеоил-розмариновата киселина (**11)** и салвианолова киселина А (**12**). От анализираните дотук данни може се твърди, че съставът на фенолните съединения е сходен, като може да се каже, че този от *T. pulegioides* е най-богат. Част от фракция **6** беше предоставен за биологични тестове и резултатите от тях показаха добре изразена активност срещу 5 от общо 7 щама патогенни микроорганизми. Този биологичен ефект вероятно се дължи на съдържанието на розмаринова киселина във фракцията.

От фракция 7 (190 mg) от ***Gentiana cruciata*** (търговска проба) е изолиран ацилирания секоиридоид ***трифлорозид*** (16.18mg). Структурата на това съединение е определена чрез 1D и 2D ЯМР спектроскопия. Метаноловият екстракт (5 g) от ***Gentiana cruciata*** (от планина Славянка) е фракциониран на 19 обединени фракции. От фракция 2 (0.8 g) е изолиран като основен компонент ***еустомозид*** (14 mg). Структурата на изолираните съединения е определена чрез 1D и 2D ЯМР спектроскопия и сравнена със спектралните данни с тези, публикувани в литературата. **За първи път секоиридоидният гликозид, *еустимозид* е изолиран от *G. cruciata*, а *трифлорозид* е изолиран за първи път от надземните части на вида.**



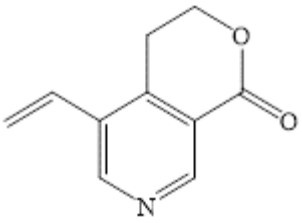
трифлорозид



еустомозид

Екстракция и изолиране на индивидуални съединения от Gentiana asclepiadea

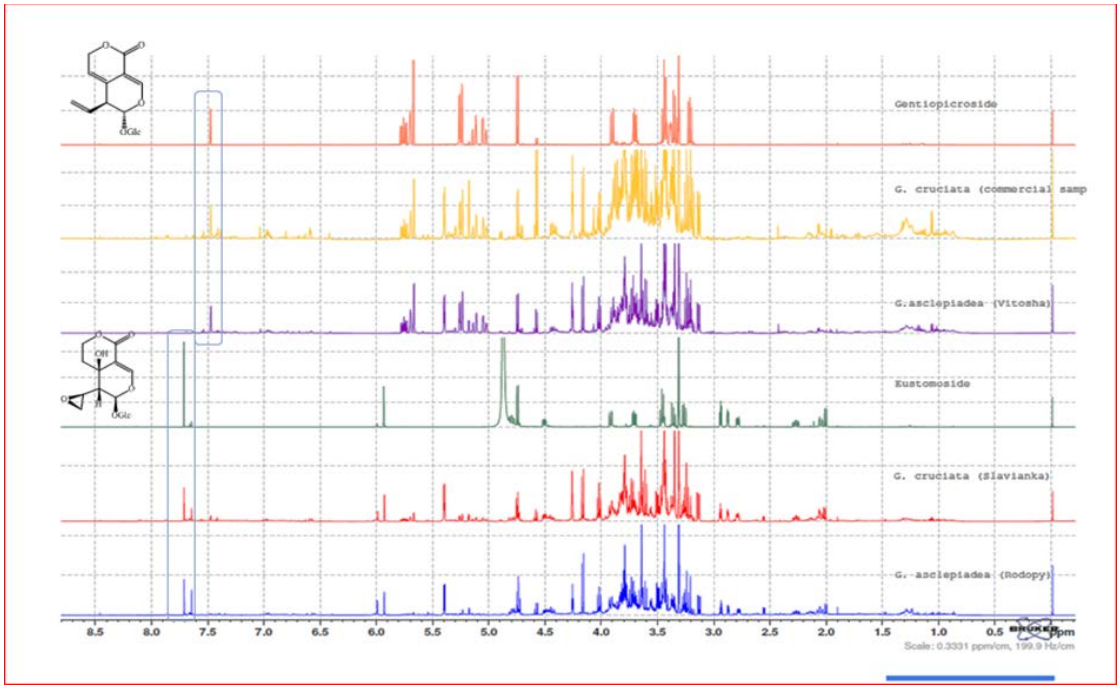
От сухия растителен материал на ***Gentiana asclepiadea*** (планините Витоша и Родопи) са получени тотални екстракти. По стандартен метод е получена сурова алкалоидна смес, която е фракционирана до 17 обединени фракции. С тънкослойна



хроматография (ТСХ) е установено наличието на три алкалоида, от които е изолиран алкалоида ***гентиамин*** (4.8 mg). Структурата му е определена чрез 1D и 2D ЯМР спектроскопия и сравнена със спектралните данни от литературата.

Химично профилиране на екстракти от видове Gentiana

Метанолните екстракти от ***Gentiana cruciata*** (търговска проба и нативното растение с произход Славянка) и ***Gentiana asclepiadea*** (с произход Витоша и Родопи) са сравнени чрез ТСХ и ЯМР метаболомен анализ. Резултатите показаха различие в иридоидния състав, както между отделните видове така и вътревидово, в зависимост от произхода на пробата. Например, търговската проба от ***G. cruciata*** и ***G.asclepiadea*** с произход Витоша показаха подобен метаболитен профил, включващ ***гентиопикрозид*** като основен компонент, докато ***G. cruciata*** с призход Славянка и ***G. asclepiadea*** с произход Родопи са с основен компонент ***еустомозид***.



Изолиране на БАВ от дървесни диворастящи гъби от природен парк Витоша. Trametes versicolor; Lenzites betulina; Fomes fomentarius; Piptoporus betulinus; Fomitopsis betulina

Диворастящите гъби са едно от природните богатства на България и интересът към лечебните им качества у нас е относително ново явление. Известно е, че някои от азиатските „супергъби", като *рейши* например се срещат и в българските гори, макар и да са доста редки. Според излязла наскоро книга за лечебните гъби в България на известния гъбар Владимир Вължаров, те са над 50 вида, предимно дървесни. Древната китайска медицина нарича тези гъби „превъзходни" заради мощните им лечебни качества. Известно е, че те се срещат и у нас, но са изключително редки, като някои от тях са и в Червената книга на изчезващите видове. Дървесните гъби имат силни противоракови свойства заради високото съдържание на полизахариди и по-точно бетаглюкани. Те действат като имуностимулатори и имуномодулатори. При тежки заболявания организмът има нужда от засилване на имунитета, а тези гъби стимулират имунния отговор.



Trametes versicolor е многоцветна дървесна гъба, която се среща по дърветата в цял свят, включително в Европа, дори и в нашата страна. Гъбата съдържа два полизахарида, един от които се нарича крестин или полизахарид – К. Той представлява протеогликан, изграден от въглехидрати и аминокиселини. Този полизахарид стимулира 2 вида клетки на имунната система: NK-клетките и Т-клетките. По този начин се засилват значително защитните сили и работата на имунната система се подобрява. Гъбата Каваратаке има доказани противоракови и имуностимулиращи свойства, които я правят много ценна.



Lenzites betulina проявява силна антиоксидантна активност - проучени са два компонента – бетулини А и В, които неутрализират свободни радикали. По този начин бетулините А и В предпазват клетката от различни патологични изменения, свързани с оксидативния стрес. Има твърдения, че бетулин А е около 4 пъти по-ефективен от витамин Е. Тази гъба има и имуносупресивна активност. Така тя намира приложение в медицината при трансплантацията на органи и тъкани, както и при терапия на автоимунни заболявания.



Fomes fomentarius е дървесна гъба, която се среща в Северна Америка, Евразия и отчасти в Африка. От много отдавна се използва в медицинската практика, като лечебните и свойства са научно доказани. Има противовъзпалително, антивирусно, антибактериално, противодиабетно действие, както и установена противоракова активност. Екстракти от гъбата потискат пролиферацията и мобилността на ракови клетки.



Piptoporus betulinus

Прахановите гъби (***Piptiporus betulinus, Fomitopsis betulina***) са дървесни гъби, които могат да се намерят в цялата страна. Образуват се по кората на широколистните дървета, най-вече върху бук. Гъбите има противовъзпалително и цитостатично действие. Притежават антибактериални, антипаразитни и противоракови свойства. В миналото са използвани и за лечение на туберкулоза. Китайците прилагат прахановата гъба при лечението на рак на гърлото, рак на стомаха, рак на матката, и за повишаване имунитета на организма.

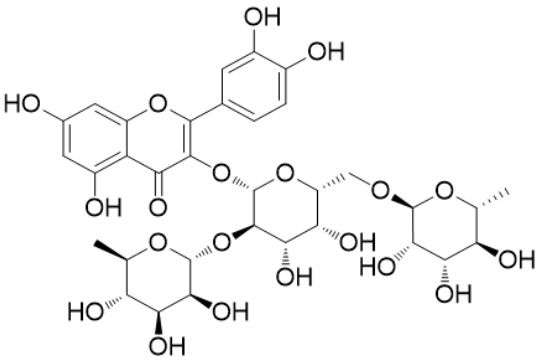


Fomitopsis betulina

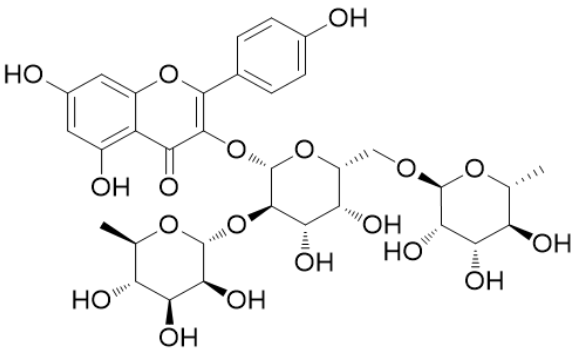
Фитохимично проучване на видове от род Astragalus, род Gypsophila и род Hypericum. Пречистване, изолиране и структурно определяне на БАВ

Работата през отчетния период продължи с изолиране на сапонини от ***Astragalus glycyphyllos***. От бутаноловият екстракт, получен от надземната част на растението са получени две сапонинови фракции (8 и 9), които станаха обект на по-нататъшно проучване. От фракция 8 е изолирано веществото **AgoS9**, а от фракция 9 – **AgoS1**. Веществото **AgoS9** е идентифицирано частично като тритерпенов сапонин и предстои структурата му да бъде определена с ЯМР спектроскопия.

От ***A. monspessulanus ssp.*** бяха получени етилацетатен екстракт (**AMM EE**) и бяха изолирани алцезефолизид (**AMM F7**) и мауритианин (**AMM F8**). Структурата на получените съединения е определена чрез HRESIMS, ЯМР, DQF-COSY, HSQC и HMBC като ***кверцетин-3-O-α-L-рамнопиранозил-(1→2)-[α-L-рамнопиранозил-(1→6)]-β-D-галактопиранозид*** (**AMM F7**) и ***кемпферол-3-O-α-L-рамнопиранозил-(1→2)-[α-L-рамнопиранозил-(1→6)]-β-D-галактопиранозид*** (**AMM F8**).



алцезефолизид (AMM F7)



мауритианин (AMM F8)

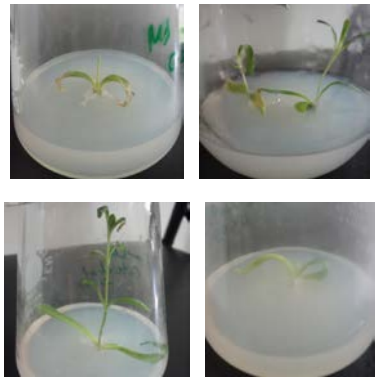
Получени бяха и два сухи обезмаслени екстракти от ***Astragalus glycyphyllos*** – AGO TE-o и AGI TE-o.

Създаване на конвенционални ин витро култури от някои селектирани видове (калусни и суспензионни). Изследване на кинетика на клетъчния растеж и продукцията на ключови БАВ.

През отчетния период продължиха и изследванията върху проучване на защитения вид ***Gypsophila trichotoma*** и ***G. glomerata***, насочено към използване на алтернативни източници за получаване на БАВ и приложението им във фармацевтичната практика. За целта започна разработването на биотехнологични подходи за култивиране на ***Gypsophila trichotoma*** и ***G. glomerata*** при изкуствени условия – създаване на ***ин витро култури***, както и провеждането на фитохимични изследвания за по-нататъшно охарактеризиране на химичния състав и разработването на метод за количествено определяне на флавоноиди.

Клетъчните култури представляват клетки и тъкани, отглеждани в *in vitro* условия повече от 24 ч. Културите, използвани за продукцията на флавоноиди биват три вида: суспензионни, калусни и надземни части. Суспензиите се отглеждат в течна хранителна среда, а калусните и надземните части – в твърда. Изследванията започнаха с подготовка за работа при растително клетъчно и тъканно култивиране, което включва: (**i**) стерилизация (на изходния растителен материал; на хранителната среда; на стъкларията и лабораторни прибори; стерилно прехвърляне на културите и тяхното култивиране при стерилни условия), (**ii**) приготвяне на хранителни среди под формата на концентрирани разтвори (DoH – хранителна среда за покълване на семена, среда за иницииране на надземни части и среда за суспензионни и калус-култури), (**iii**) стерилизиране и култивиране на семена и (**iv**) създаване на култури.

Създаване на култури от надземни части на растението



Надземна част от *G. trichotoma* върху различни хранителни среди

Обикновено стерилизираните семена покълват в твърдата DoH среда за 7 - 14 дни. Покълналите семена се прехвърлят в нова среда, която е благоприятна за развитие на надземни части и се култивират при специално осветление и определена температура. Така получените стерилни диференцирани растения се субкултивират на всеки 3 - 4 седмици в нова хранителна среда. На фигурата са показани надземни части от ***G. trichotoma*** върху различни варианти на хранителна среда, като растението се развива най-трудно в модификацията с добавен NaCl. Надземните култури представляват филизи без корени и недиференциран калус. Те се считат като генетично по-стабилни от недиференцираните калус или суспензионни култури. Поради това повечето надземни култури се индуцират с оглед използването им за микроразмножаване. В случая на ***G. trichotoma*** микроразмножаването е от голямо значение, тъй като видът е застрашен от изчезване. Вкореняването може да се постигне, когато филизите бъдат прехвърлени в агарно втвърдена хранителна среда, съдържащи единствено ауксини, а корени обикновено се развиват в рамките на две седмици.

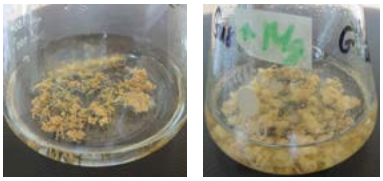
Създаване на калус култури

За създаване на калус култури младите стръкчета се нарязават със стерилен скалпел при асептични условия, експлантите (стерилни органи или части от тях) се полагат на твърда хранителна среда и живите клетки от експланта се делят като по този начин се получава недиференцирана клетъчна маса – калус. Некротизираните части, които са с тъмно кафяво оцветяване, се отстраняват. В новата хранителна среда калусът продължава да се размножава, независимо от донорната тъкан и се субкултивира на 21 дневен период при температура 25°C на светло.

Създаване на суспензионни култури

Суспензионните култури са клетки или малки агрегати от клетки в течна хранителна среда. Изходен материал за създаването им са недиференцираните клетки на калуса. Суспензионните култури имат по-бърз растеж от тези на калуса и могат да се

сравнят с култури на микроорганизми. Суспензиите се получават като в течна хранителна среда се поставя стерилна стъклена фуния с мрежа и чрез нея се престъргва по около 5 g материал от калуса. Суспензионните култури се поддържат при непрекъснато разклащане на клатачна машина, което пречи на утаяването на клетките и осигурява достъпа им до хранителната среда. След 5 дни съдържанието се филтрува и супернатантата се изхвърля. Така се получава концентрирана клетъчна суспензия. По 20 ml от нея се прехвърлят в нови колби, съдържащи свежа хранителна среда. Тази операция се означава като първи пасаж и се повтаря пет пъти през 7 дни. След петия пасаж се смята, че суспензионните култури са напълно установени и не е необходимо да се концентрират при пасажиране. На всеки 14-18 дни 2,5 g ± 0,2 g клетки се прехвърлят в свежа хранителна среда.



Суспензионна култура от *G. trichotoma* върху различни хранителни среди

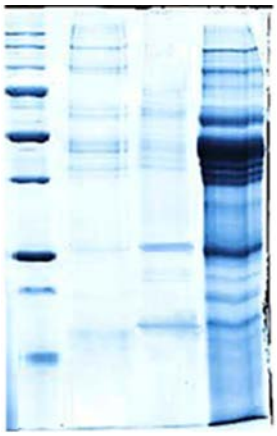
Разработен и валидиран е ВЕТХ метод за количествен анализ на сапонарин, с помощта на който е определено количественото съдържание на продуцираните флавоноиди (*сапонарин*) в *ин витро* култури с различен произход. По същия начин са анализирани и проби от надземни части и калусни култури на вида ***Gypsophila glomerata***. Установено е, че количеството на сапонарин варира сред различните видове култури – надземни части, калус и суспензии. При това, съдържанието на флавоноида се различава значително при всеки един от гореспоменатите типове. Установено е, че надземните части, отглеждани на основна среда натрупват 4.08% сапонарин, суспензиите синтезират 1.81%, докато калусите не натрупват статистически значимо количество от съединението. Резултатите показват, че най-голямо количество е установено в надземните култури за 21 дни, получени от ***G. trichotoma*** - 2.30%. Най-високото количество продуциран сапонарин е постигнато в калус култури на ***G. trichotoma*** – 0.75%. Продуктивността на желаното БАВ в *ин витро* културата е от решаващо значение за практическото й прилагане за производство на флавоноиди. Установено е, че надземни култури от изследваните видове ***Gypsophila***, продуцират повече сапонарин от конвенционалните калус култури. При това, никоя друга производствена система като недиференцирани клетки обаче, не предлага възможност за мащабно култивиране с цел промишлено производство на растителни продукти. Производството по биотехнологичен път е по-надеждно, по-просто и по-предвидимо, а изолирането на биологично

активни вещества може да бъде бързо и ефективно, в сравнение с добива от сложни смеси, изолирани от цели растения.

Задача 1.2. Изолиране на екстракти БАВ от животински произход и тяхното охарактеризиране. Изпълнител: ИОХЦФ-БАН

Изолиране и пречистване на БАВ от хемолимфата на охлюви Rapana venosa и Helix lucorum

Събраната хемолимфата от морски охлюви ***R. venosa*** (от стъпалото) е подложена на фракциониране, при което са получени **4 фракции**, съдържащи биологично активни вещества с различни молекулни маси: пептидна фракция с M_w под 10 kDa; фракция,



съдържаща биоактивни компоненти с M_w между 10-50 kDa; фракция 2, съдържаща биоактивни компоненти с M_w между 50-100 kDa; и високомолекулна фракция, съдържаща биоактивни компоненти с M_w над 100 kDa, която е използвана за изолиране на нативния гликопротеин – **хемоцианин RvH** с молекулна маса ~8000 kDa, изграден от две електрофоретично различни субединици (RvH1 и RvH2). Основните протеинови фракции са охарактеризирани с гел електрофореза.

Събраната хемолимфата на градинския охлюв ***H. lucorum*** (свободно живеещ в България) е разделена на **две основни фракции**, съдържащи съединения с M_W под и над 100 kDa. Концентрираната протеинова фракция над 100 kDa, съдържаща общия хемоцианин (Hc), е разтворена. Нискомолекулната фракция, съдържаща биологично активни съединения с M_W под 1 kDa, е получена от фракцията под 100 kDa.

Ензимна хидролиза на пречистената хемолимфа от градински охлюви и получаване на пептидни фракции

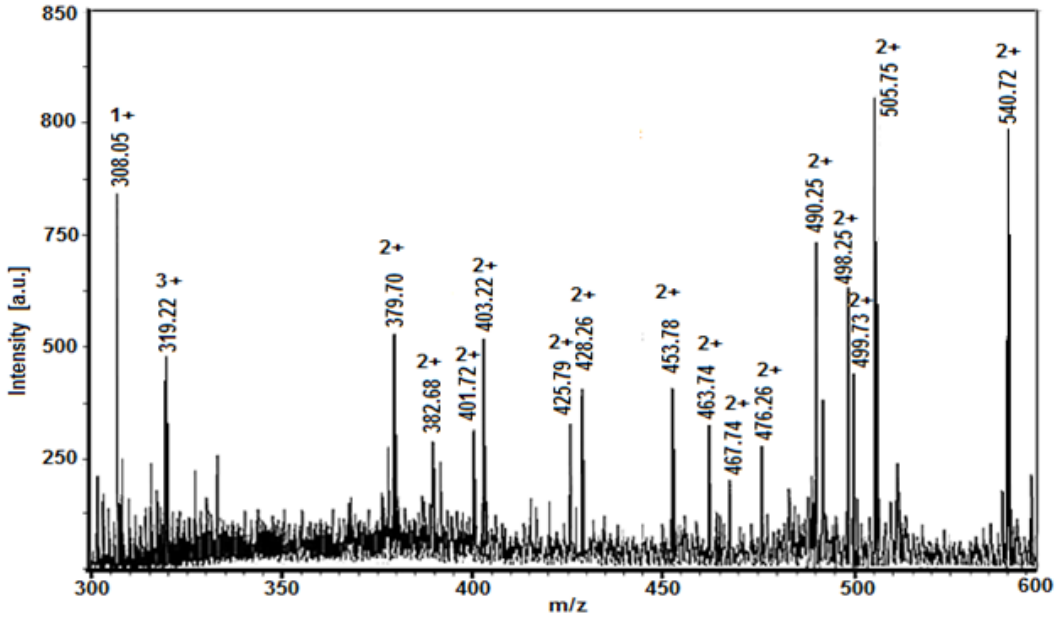
Структурната субединица βc-HaH, получена от хемоцианиновия хидролизат е подложена за 24 часа на протолитична хидролиза с трипсин, при което са изолирани:

- хидролизат на βc-HaH, от който са изолирани 8 фракции с молекулни маси между 45 - 65 kDa, определени електрофоретично;

- хидролизат на βc-HaH под 30 kDa, съдържащ главно пептиди и полипептиди с молекулни маси под 30 kDa;

Определяне на структурата на получените пептиди

Аминокиселинните последователности са определени чрез мас-спектрометричен анализ (MALDI-MS). Анализът на двете фракции от хемолимфа на ***H. lucorum*** показва, че хемолимфа съдържа пептиди с молекулни маси между 300 - 1000 Da.



MALDI-MS спектър на фракция с M_W под 1 kDa в областта m/z от 300 до 600

MALDI-MS спектърът е доминиран от пептиди, представени предимно като двойно заредени йони $[M+2H]^{2+}$, но освен тях, се наблюдават един $[M+H]^{+}$ йон при m/z 308.046 Da и един тройно зареден йон $[M + 3H]^{3+}$ при m/z 319.22 Da. Откритият йон $[M+H]^{+}$ при m/z 308.046 Da съответства на глутатион (GSH) – трипептид, съдържащ гама-пептидна връзка между карбоксилната група на глутаматната странична верига и цистеина. GSH участва в регулирането на клетъчния цикъл и играе роля на антиоксидант при отстраняването на много видове реактивни радикали. GSH защитава важни клетъчни компоненти от окислително увреждане, като реагира директно с реактивните видове кислород ($HO^{\bullet}$, HOCl, $ONOO^{-}$, $RO^{\bullet}$, $RO_2^{\bullet}$, CO_3^{-}, NO_2, $^1O_2$), липидни пероксиди и тежки метали и действа като субстрат на антиоксидантния ензим глутатион пероксидаза.

От проведеното *de novo* MS/MS секвениране са идентифицирани структурите на пептидите. Определени са M_W, pI и средната степен на хидропатичност (GRAVY) на

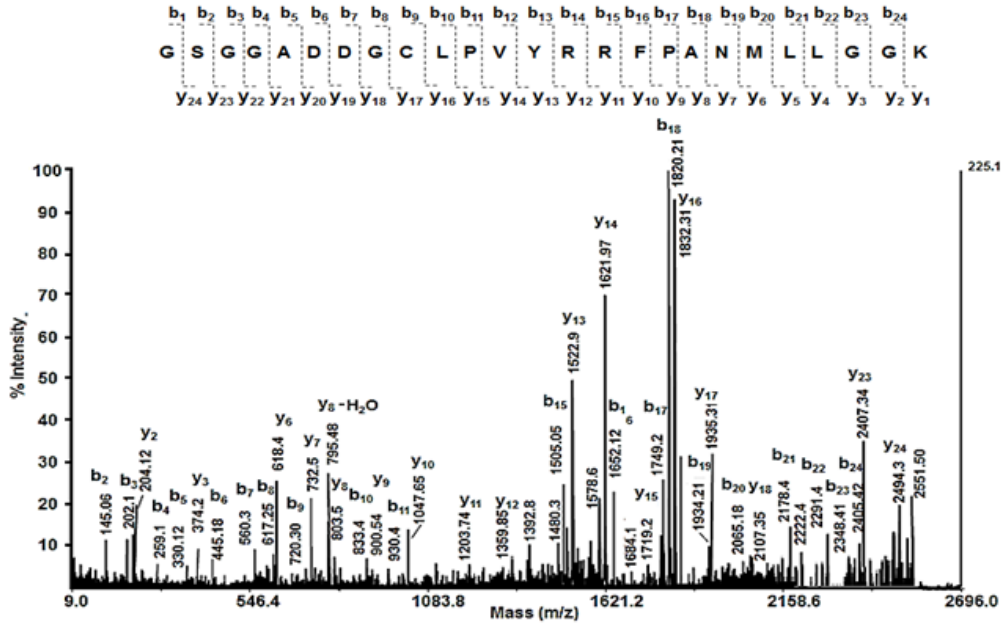
пептидите. Анализът показва, че повечето от тях се характеризират с амфипатна структура и хидрофобни повърхности.

Аминокиселинните последователности (АКП) на идентифицираните пептиди във фракция с MW под 1 kDa от хемолимфа на ***H. lucorum***, показват наличието на различни аминокиселинни остатъци (АКО), но най-вече Val, Leu/Ile, Pro, Lys, Phe, Met, His, Trp и Tyr. Присъствието на хидрофобни (Leu, Val и Phe), хидрофилни (His, Pro и Lys) и ароматни АКО (Phe и Tyr) в АКП на пептидите, допринася за антиоксидантната им активност. Установено е че, фракцията под 1 kDa от хемолимфата от ***Helix lucorum*** има висок ефект, като ловител на хидроксилни радикали, което е следствие от идентифицираните съединения в нея.

Пречистените пептиди от фракция с M_W между 1-3 kDa са анализирани чрез тандем мас-спектрометрия. Молекулните маси на пептидите са измерени чрез MALDI-TOF-MS при дължина на вълната 355 nm. MALDI-MS спектърът на фракцията, съдържаща компоненти с молекулни маси между 1-3 kDa, е доминирана от пептиди, представени като молекулни протонирани йони $[M+H]^+$ при m/z 1274.27, m/z 1526.65, m/z 1693.97, m/z 1860.1, m/z 2197.66, m/z 2326.2, m/z 2552.51 и m/z 2896.56. Първичните структури на пептидите са идентифицирани чрез *de novo* секвениране на протонираните молекулни йони $[M+H]^+$, чрез MALDI-TOF-MS/MS анализи. От MALDI-TOF-MS/MS спектъра, след проследяване на y и b фрагментните йонни, е определена АКП на пептид $[M+H]^+$ при m/z 2551.51, съдържащ 24 аминокиселинни остатъка. Определена е молекулна маса на пептида, изчислена въз основа на АКП 2550.25 Da и изоелектричната му точка (pI): 8.20.

Фракцията с M_W под 100 kDa (изолирана от хемолимфата на *H. lucorum*), освен по-горе упоменатите съединения, съдържа и различни протеини. Резултатите от проведения MALDI-TOF- MS анализ показват наличие на протеини с молекулни маси между 13 000-120 000 Da. Предварителните резултати от съпоставянето на масите на протеините с базата данни на UniProt (*UniProtKB*) показва, че някои от тях могат да се отнесат към по-рано открити протеини в охлюви. Например: протеин, представен като $[M+H]^+$ при m/z 15 288.689 Da вероятно съответства на ензима каталаза (CAT) с молекулна маса 15 372 Da, определен в охлюв *Lymnaea stagnalis* (C3U1W7_LYMST). Установеният в хемолимфа на охлюв *L. stagnalis*, ензим супероксид дисмутаза (SOD) с M_W 15774 Da (Q7YXL9_LYMS), вероятно съответства на същия ензим, представен като мономер $[M+H]^+$ при m/z 15901.85 Da и като димер при m/z 31802.704 Da в хемолимфата

на *H. lucorum*. Извънклетъчните супероксидни дисмутази са от решаващо значение за балансиране на нивото на реактивните кислородни видове в извънклетъчния матрикс на еукариотите и служат като антиоксидантни ензими от първа линия.



MALDI-MS/MS спектър на пептид представен като $[M+H]^+$ при m/z 2551.50 Da, в положителен режим на йонизация

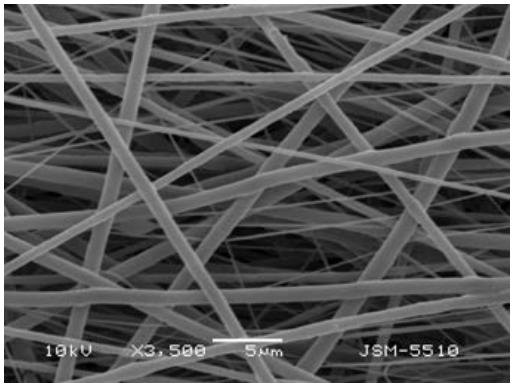
Освен наличие на супероксидни дисмутази, са определени протеини принадлежащи към семейството глутатион пероксидазата. Установено е много голямо сходство между глутатион редуктаза (C3U1W6_LYMST) с M_W от 13 977 Da в охлюв *L. stagnalis* и молекулен йон $[M+H]^+$ при m/z 13828.182 Da в хемолимфата на *H. lucorum*, затова предложихме съответствие между тях. Молекулният йон $[M+H]^+$ при m/z 24 937.218 Da, вероятно съответства на ензима глутатион пероксидаза (GPx), определен *в Haliotis discus* с M_W 24945 Da (A0A0H3V5M4_HALDI) и M_W 24809 Da (A0A0H3V5S1_HALDI), както и в *Haliotis diversicolor supertexta* с M_W 24989 Da (D6PW93_HALDV). Основната биологична роля на GPx е да предпазва организма от оксидативно увреждане. Ензимите, принадлежащи към семейството глутатион пероксидаза (GPx), са семейството на екстрацелуларни протеини, разтворени в хемолимфа на различни гастроподи, като *Biomphalaria glabrata* (сладководен охлюв), *Aplysia californica* (калифорнийски морски заек), *Reishia clavigera* (морски охлюв *Purpura clavigera*), аболони *H. diversicolor supertexta* и *H. discus*, с молекулно тегло в интервала между 20 – 27.5 kDa.

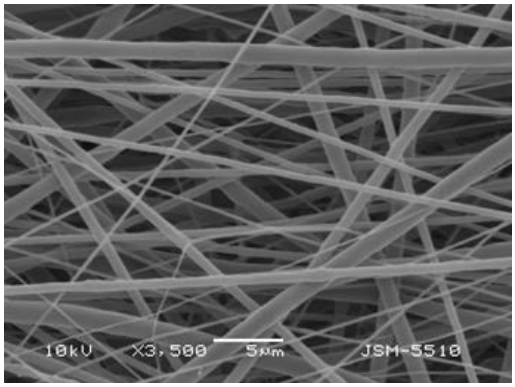
Установено е че, фракцията под 100 kDa от хемолимфа от *Helix lucorum* има висок супероксид-улавящ ефект (82% инхибиране), като супероксидните анион радикали са генерирани фотохимично.

Задача 1.3. Създаване на иновативни средства и доставящи системи, в които са включени екстракти от БАВ. Изпълнител: ИП-БАН

Получаване и охарактеризиране на нискотоксични микро- и наноразмерни системи от биосъвместими и/или биоразградими полимери от възобновяеми източници с включени екстракти или моделни индивидуални БАВ (характерни за съответните екстракти) от растителен произход

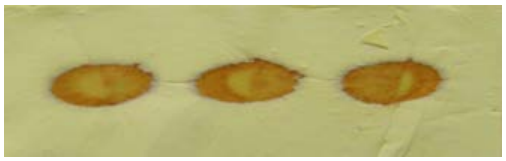
През отчетния период продължи работата по получаване и охарактеризиране на нови електроовлакнени влакнести материали от биосъвместим и биоразградим алифатен полиестер (PE) от възобновяеми източници и нейоногенен водоразтворим полимер (поливинилпиролидон, PVP), съдържащи комбинация от **етерично масло от *Salvia sclarea*** и индивидуално БАВ куркумин. Етеричното масло от ***S. sclarea*** съдържа букет от БАВ с желани биологични свойства – антиоксидантни, антимикробни, противотуморни и др. Куркуминът е биологично активно полифенолно съединение, което също притежава ценен комплекс от биологични свойства – антиоксидантни, антимикробни, противотуморни, имуностимулиращи и др. Използваният нейоногенен водоразтворим полимер PVP е способен да взаимодейства чрез водородни връзки с някои от БАВ, влизащи в състава на етеричното масло или с куркумина, което подобрява тяхната бионаличност. Влакнестите материали бяха получени чрез едновременно електроовлакняване на два различни по състав разтвора и затова получените влакнести материали са съставени от два вида влакна – PE/PVP/*S. sclarea* със среден диаметър от 1090 ± 230 nm и PVP/куркумин със среден диаметър 350 ± 140 nm. При същите условия на електроовлакняване бяха получени и влакнести материали от PE/PVP + PVP, които не съдържат етерично масло и куркумин. Те също бяха съставени от два вида влакна – PE/PVP със среден диаметър 1170 ± 170 nm и PVP със среден диаметър 360 ± 80 nm. Измерени са и стойностите на ъглите на омокряне спрямо вода и е установено, че както изходните влакнести материали, така и материалите, съдържащи етеричното масло и куркумина са хидрофилни, със стойност на ъгъла на омокряне спрямо вода – 0°.







Влакнести материали, които не съдържат етерично масло и куркумин



Влакнести материали, които съдържат етерично масло от *S. sclarea* и куркумин

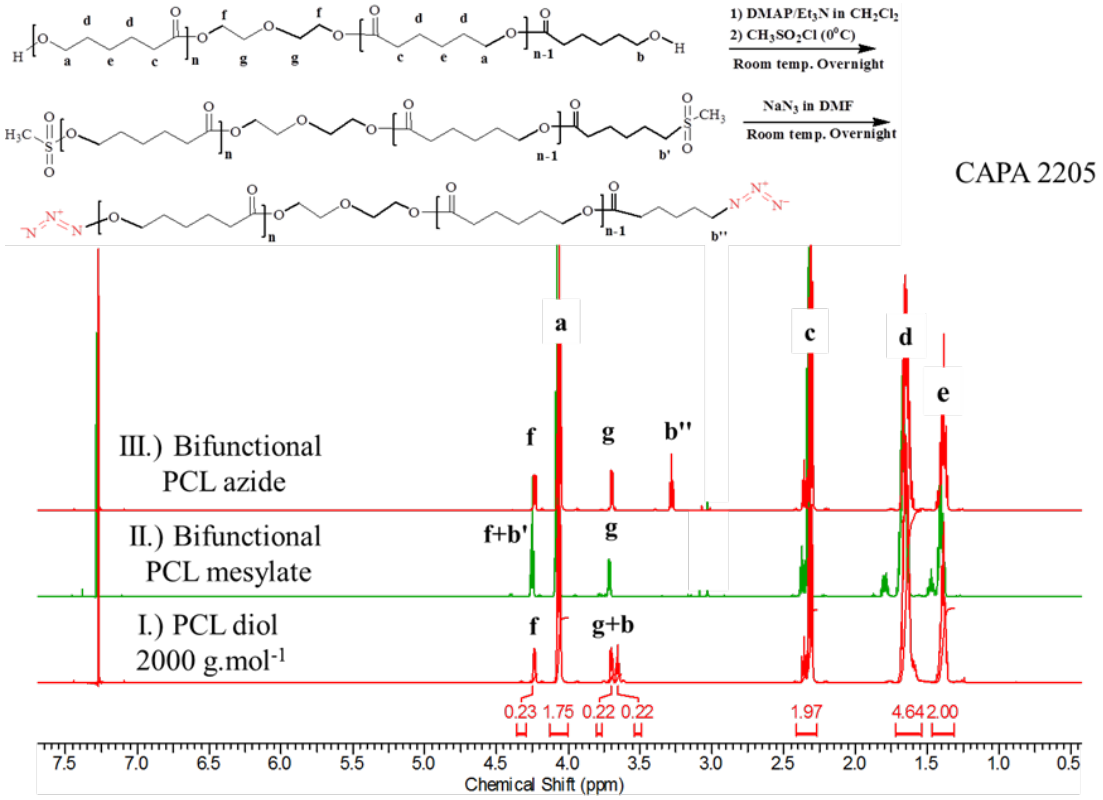
Антиоксидантната активност на влакнестите материали с включени етерично масло от ***S. sclarea*** и куркумин, беше оценена чрез тест за улавяне на DPPH•. За сравнение, беше изучена и антиоксидантната активност на изходния мат, несъдържащ етерично масло и куркумин. Този мат показва твърде ниска антиоксидантна активност (абсорбцията на DPPH• намалява приблизително с 3.3 %). След 30 min контакт с разтвор на DPPH• матовете, съдържащи етерично масло и куркумин притежават висока антиоксидантна активност (абсорбцията на DPPH• намалява приблизително с 64.1 %). Установено е, че при матовете с включени етерично масло и куркумин намаляването на абсорбцията на DPPH• е по-голямо от намаляването, наблюдавано при етеричното масло от *S. sclarea* (с приблизително 10,2 %) и куркумина (с приблизително 56%) поотделно.

От влакнестите материали с включени етерично масло от *S. sclarea* и индивидуално БАВ куркумин са подготвени пробни тела със зададени размери и форма, за изследване на тяхната антимикробна активност. Резултатите от тези изследвания са обобщени в заявка за патент и за полезен модел, които са внесени като искане за предварително проучване на изследователския резултат в Патентното ведомство на РБългария.

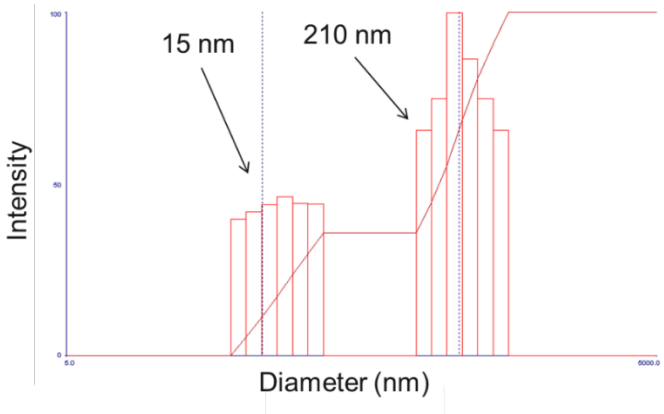
Разработване на интелигентни наноносители от функционални съполимери с включени екстракти на БАВ

Бяха проведени серия от опити за модифициране на ди-, три- и тетрахидрокси поли(ε-капролактони) за получаване на **съполимери полиглицидол-поли(ε-**

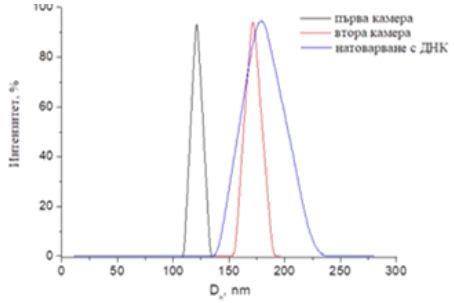
капролактон) с различни архитектури. Първият етап от реакцията включваше мезилиране на крайните хидроксилни групи, а вторият – реакция на мезилатните групи с натриев азид, с цел тяхното превръщане в крайни, способни да встъпят в „клик“ реакция, азидни групи. Получените мезилатни и азидо производни бяха охарактеризирани чрез ЯМР спектроскопия.

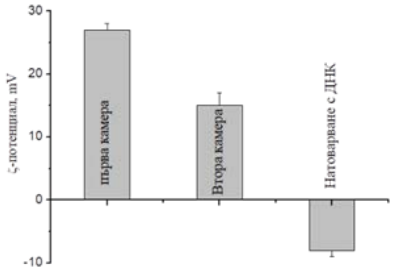


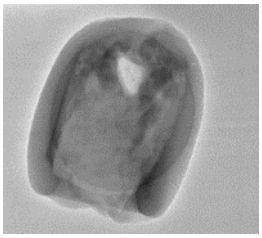
Чрез статично и динамично светлоразсейване, бяха определени някои параметри, характеризиращи самоасоциирането във водна среда на полимери със звездовидна архитектура, представляващи **каликс(8)арени, функционализирани с полиоксиетиленови вериги**. Изследването беше проведено в концентрационен интервал над предварително определената критична концентрация на мицелообразуване, при постоянна температура. Получените данни за разпределението на частиците за полиоксиетилирания каликсарен с 19 оксиетиленови звена във воден разтвор, показа наличието на две популации частици, с размери от 20 nm и от 210 nm. Това демонстрира много добро съответствие с предварителни данни, получени от други анализи.



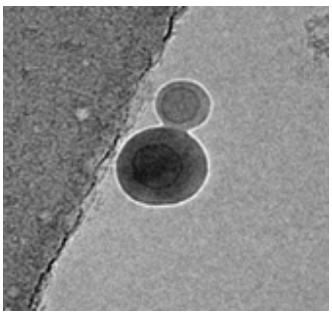
Получени са и наноносители за активни вещества и биологични молекули на основата на наноразмерни частици от **цианакрилатни полимери, покрити с полимерна обвивка от поли(*N*-изопропилакриламид)**. Детайлното им охарактеризиране с различни аналитични методи, като динамично и електрофоретично светлоразсейване и TEM, показа че новите носители се характеризират с мултикамерна структура.

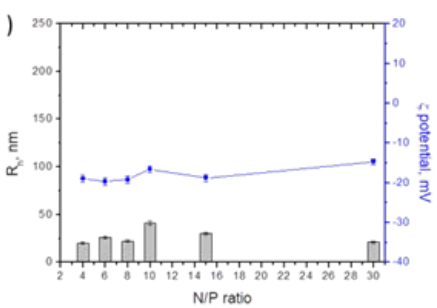


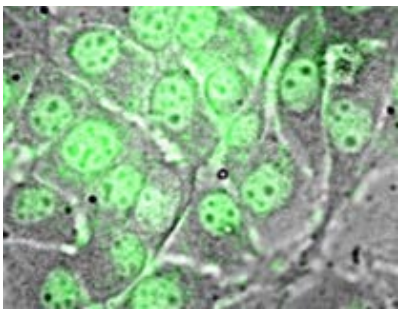




Полимерни наноразмерни частици (мицели) бяха получени чрез самоасоцииране във водни разтвори на **съполимери на основата на циклични N-заместени полиакриламиди**. Мицелите бяха детайлно охарактеризирани чрез различни аналитични методи. Частиците бяха с хидродинамичен радиус около 45 nm и тясно разпределение по размери. Характеризираха се с добра колоидна стабилност и положителен ζ потенциал. Проведените първоначални биологични тестове показаха, че системите се характеризират с ниска токсичност и добра клетъчна интернализация.







Получаване и оптимизиране състава на иновативни полимерни хидрогелни носители на БАВ за локално и перорално приложение

Изследванията продължиха към оптимизиране на състава на криогелни носители на канабидиол, получени чрез криогенно третиране и фотохимично омрежване на водни разтвори на хидроксиетилцелулоза (HEC) и хидроксипропилцелулоза (HPC). Нанокомпозитните криогелове са получени чрез UV-индуцирано омрежване в замразено състояние. Иновативното при така разработените криогелни системи е че, хидрофобния БАВ е натоварен предварително в мицели, които в последствие са включени в стените на макропорестите носители. Това дава възможност както за получаване на водоразтворима форма на канабидиола, така и за постигане на контролирано освобождаване на активното вещество. Размерът и разпределението по размери на мицелите бяха определени посредством динамично лазерно светлоразсейване. Резултатите показват образуването на малки мицели с хидродинамичен диаметър (Dh) от около 21 nm и мономодално разпределение. Наличието на допълнителен, по-малко интензивен пик, предполага наличието на по-големи агрегати от частици в колоидния разтвор с размер около 173 nm. Въпреки това, може да се предположи, че натоварените със CBD мицели са доминиращата популация в пробата, тъй като вторият пик не се вижда в графиката представена като разпределение на частиците по обем. На следващ етап от мицелите, натоварени със CBD бяха включени в разтвор на HEC и тези дисперсии бяха подложени на UV индуцирано фотоомрежване до получаване на гел. Резултатите от изследване върху нанокомпозитна система за контролирано освобождаване на лекарства на основата на криогелна HEC матрица и полимерни мицели, съдържащи канабидиол, бяха обобщени и публикувани в специализираното научно списание с отворен достъп ***Polymers*** (**IF 3.164/Q1**). Продължиха и изследванията върху друг вид криогелни носители, съставени от HEC или HPC мрежа, в която са включени β-циклодекстринови (β-CD) звена. Усилията бяха насочени към оптимизиране на състава на носителите с цел постигане на ефективно имобилизиране на канабидиол в хидрофобната кухина на β-CD и забавено освобождаване на активната субстанция в буферен разтвор. Бяха синтезирани серия от криогелове с различно съдържание на β-CD, които посредством вече разработения от нас метод за натоварване на хидрофобни БАВ в полизахаридни криогелове, съдържащи β-CD, бяха натоварени с канабидиол и изследвани от колеги от ФФ-МУ-София за цитотоксичност и профил на освобождаване.

Голяма част от експерименталната работа беше извършена от инж. Явор Данов, който е млад учен.

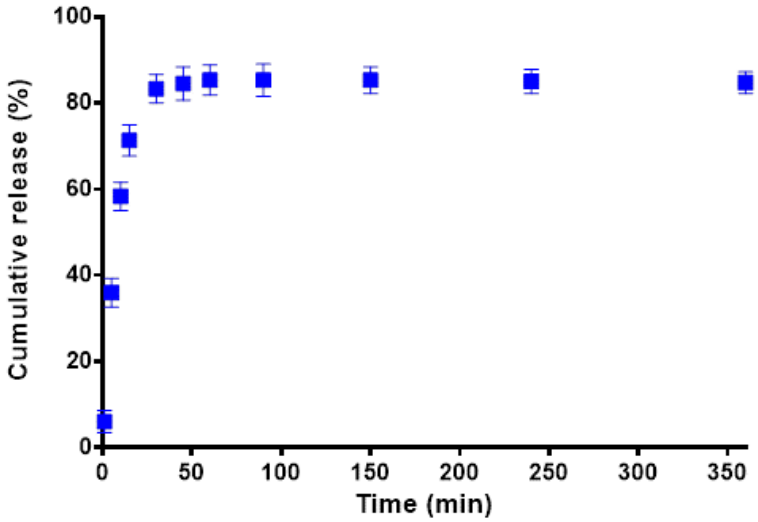
В изпълнение на работната програма бяха синтезирани нови съполимерни мрежи на основата N-изопропилакриламид (NIPAAM) и полиетиленгликол (PEG) с различна молна маса. Мрежите бяха получени чрез редукционно-окислителна съполимеризация на PNIPAAM с полиетиленгликолдиакрилат (PEGDA), инициирана върху PEG. С оглед на потенциалното медицинското приложение, мрежите бяха синтезирани прилагайки екологичносъобразни реакционни условия – във водна среда при ниска реакционна температура. В зависимост от композиционния състав, получените съполимерни мрежи показват различна равновесните степени на набъбване във вода при 25°C, но по-висока в сравнение със съответните мрежи получени с тетраетиленгликол. Това предполага по-добри възможности за имобилизиране на хидрофилни биологично активни вещества, както и на вещества от водни екстракти от природни източници. В ход е изследване на кинетиката на набъбване на мрежите във вода и изучаване на промяната на равновесната степен на набъбване на съответните хидрогелове при промяна на температурата.

Задача 1.4. Изследване на ефективност и капацитет на натоварване на системите с БАВ и на профил на освобождаване от тях. Изпълнители: ИП-БАН, МУ-Пловдив, МУ-ФФ-София

Определяне на ефективността и капацитета на натоварване на иновативните нискотоксични системи с БАВ от растителен произход, както и на профил на освобождаване от новите системи

През втория етап на договора продължиха изследванията по определяне на *ин витро* профила на освобождаване на БАВ от растителен произход – моделния флавоноид кверцетин (QUE) от влакнестите материали на производно на целулозата (CD) и водоразтворимия полимер полиетиленгликол (PEG). За оценяване на влиянието на състава на полимерната матрица върху профила на освобождаване на QUE от влакнестите материали CD/PEG, освобождаването на QUE е проследено спектрофотометрично в ацетатен буфер (pH 5.5) в присъствие на Tween 80, при 37°C. Повърхностното активно вещество Tween 80 често се използва при слабо разтворими БАВ за подобряване на тяхната разтворимост и повишаване на абсорбция им при перорално приложение. Установено е, че QUE се освобождава бързо от влакнестите

матове, когато в тях е включен водоразтворимия полимер PEG. Количеството на освободения QUE от CD/PEG/QUE влакнестите материали е около 85.3 % за 360 min и остава непроменено за 24 h. Няколко фактора оказват влияние върху профила на освобождаване на QUE от влакнести материали, като дифузията на нискомолекулното БАВ зависи от: (*i*) омокрянето и набъбването на матовете, които зависят от техните хидрофилно-хидрофобни характеристики и степента на кристалност на полимера, (*ii*) кристалното/аморфното състояние на БАВ, включени във влакната (благоприятно за освобождаването е аморфното им състояние), (*iii*) концентрационен градиент, основан на дифузията на БАВ от влакната, както и от (*iv*) дифузия на водоразтворими олигомери от електроовлакнените матове. В допълнение, дифузията на БАВ зависи и от морфологията на влакната (среден диаметър, наличие на дефекти или пори). Ние установихме, че освобождаването на QUE от матовете CD/PEG/QUE зависи от хидрофилността на материалите, както и от взаимодействието между QUE и PEG. Първо, хидрофилността на PEG, съдържащ се в матовете подпомага проникването на молекулите на средата в матовете. Това осигурява условия да се образува водоразтворим комплекс на основата на водородни връзки между QUE и PEG в потопените матове, което подпомага освобождаването на QUE във водната среда.

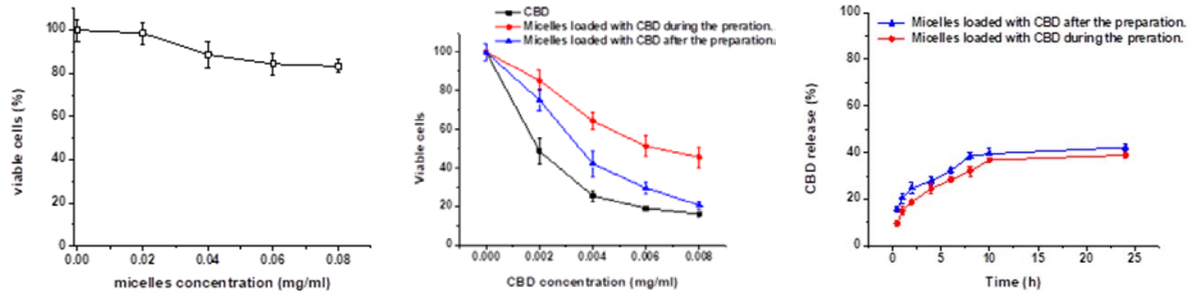


Профил на освобождаване на QUE от CD/PEG/QUE влакнести материали

Разработване на ефективен метод за натоварване на наноносителите от функционални съполимери с БАВ и с желан профил на освобождаване

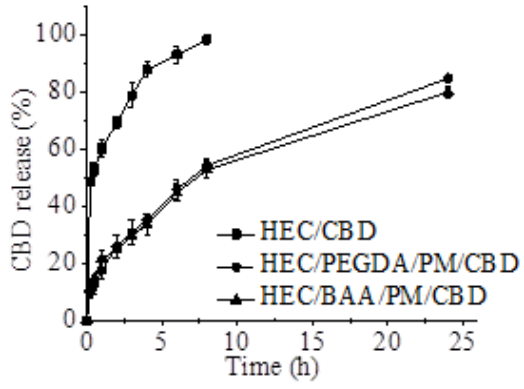
Намерени са условия за получаване на монодисперсни наноразмерни полимерни носители от **съполимери полиглицидол-полиоксипропилен-поли(ε-капролактам)-**

полиоксипропилен-полиглицидол. Получените частици, използвани за натоварване с канабидиол (CBD), се характеризират с тясно разпределение по размери и среден хидродинамичен радиус от 140 nm. Изследвани бяха и цитотоксичността и освобождаването на натоварени с канабидиол наноазмерни полимерни частици от **полиглицидол-поли(ε-капролактам)-полиглицидол**. Натоварването беше извършвано по различни начини: (**i**) едновременно с формирането на частиците и (**ii**) натоварване на предварително формирани частици.



Намерено е, че освобождаването на CBD от разработените мицелни носители е контролирано и начинът на включване на канабидиола в мицелите оказва влияние върху освобождаването му. Резултатите показват и ясно изразена зависима от концентрацията цитотоксичност. За разлика от мицелите, натоварени с активното вещество, празните носители са лишени от цитотоксичност – дори и при най-високите изследвани концентрации не се наблюдава потискане на клетъчната жизненост.

Оптимизиране на оригинален метод за натоварване на полимерни хидрогелни носители с БАВ и с желан профил на освобождаване



Изследвани бяха профилите на освобождаване на CBD от разработените нанокомпозитни криогелни носители спрямо CBD, натоварен в криогели, които не съдържат мицели. Освобождаването на канабидиол от чисти и нанокомпозитни криогели показа значителна разлика в профилите. Чистият криогелен носител се характеризира с първоначално бързо освобождаване на канабидиол, на практика този носител освобождава приблизително 50% от натоварения CBD през първия час от експеримента като пълно освобождаване се

постига в рамките на 8 часа. Профилите на освобождаване от нанокомпозитните криогелни носители показват контролирано освобождаване на канабидиол, без признаци на първоначален "*birst*" ефект. Наблюдаваните различия в профилите на освобождаване на CDB от чисти и нанокомпозитни криогелни системи най-вероятно се дължат съответно на различната процедура на зареждане и локализация на лекарственото активно вещество. Всъщност може да се предположи, че чрез накисване на предварително образувания HEC криогел в етанолов разтвор на CBD и последващо изпаряване на разтворителя, по-голямата част от количеството на CBD се вкарва в порите на гела, където разтварянето и дифузията на CBD протичат бързо. За разлика от това, зареждането на CBD в мицеларни ядра, комбинирано с криогенната процедура, дава системи, съдържащи CBD, който е вграден в стените на полимерната матрица. Поради това освобождаването от мицелите и дифузията на лекарствените молекули в полярната среда е значително по-бавно. Трябва да се отбележи, че стратегията за натоварване на канабидиол в стените на криогелната матрица чрез използвания от нас метод може да бъде осъществена само с водоразтворима форма на CBD, като мицеларен разтвор.

Работен пакет 2 **Изследване на антиинфекциозния потенциал на създадените нискотоксични биологично активни средства/системи**
Ръководител на работния пакет**: проф. д-р Светлозара Петкова**

Задача 2.1. Оценка на антимикотичните свойства на създадените средства/системи срещу гъбични щамове, които са развили множествена лекарствена резистентност. Изследване на механизъм на действие. Изпълнители: ИП-БАН, МУ-Пловдив, ПУ

In vitro тестове за оценка на противогъбичната активност на иновативните нискотоксични системи с включени екстракти или моделни индивидуални БАВ (характерни за съответните екстракти) от растителен произход. Изследване на антимикотичната активност спрямо представители от род Candida.

Проведено беше оценяване на антибактериалната и противогъбична активност на получените нови влакнести материали, съдържащи комбинация от **етеричното масло *S. sclarea*** и индивидуалното БАВ куркумин спрямо Грам-положителните бактерии *Staphylococcus aureus* ATCC 1805, Грам-отрицателните бактерии *Escherichia coli* ATCC 3397 и диморфните дрожди от вида *Candida albicans* ATCC 10231. Антибактериалната

активност на тези влакнести материали е определена при използване на референтен диск дифузионен метод *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) M2-A9, а противогъбичната активност – при използване на референтен диск дифузионен метод CLSI M44-A2. При този метод активността се оценява чрез измерване на диаметъра на стерилната зона (в mm) около влакнестите материали в петрита с агарова среда. За разлика от влакнестите матове, които не съдържат етеричното масло и индивидуалното БАВ, влакнестите материали, съдържащи етеричното масло *S. sclarea* и индивидуалното БАВ куркумин проявяват антибактериална активност спрямо Грам-положителните бактерии *Staphylococcus aureus* ATCC 1805 и противогъбична активност спрямо *Candida albicans* ATCC 10231. Около тези материали са наблюдавани стерилни зони при тестваните Грам-положителни бактерии и гъби. Тези влакнести материали не проявяват антибактериална активност спрямо Грам-отрицателните бактерии *E. coli* ATCC 3397.

Изследване на антифунгалния потенциал на създадените активни нискотоксични съединения и определяне на дозата за инхибиране на растежа и развитието на фунгалната култура

Преди влагането на екстракта от семена на ***Гинко билоба*** в системи за доставяне на биологично активни вещества, бяха изпитани противогъбичните свойства на метаноловия екстракт. Тествани бяха 5 щама гъби с 9 различни концентрации на сухо вещество и негативна контрола метанол. Екстрактът показа слаба активност по отношение на 4 щама, като определените минимални инхибиращи концентрации бяха следните: спрямо *A. niger* ATCC 1015 – 0.875 mg/ml, спрямо *Penicillium* sp. – 1.75 mg/ml, спрямо *Rhizopus* sp. – 0.109 mg/ml и спрямо *F. moniliforme* ATCC 38932 – 3.5 mg/ml.

Задача 2.2. Оценка на антипаразитната активност на новите средства/системи върху моделни системи. Изследване на механизъм на действие. Изпълнител: ИЕМПАМ-БАН

Изследване на механизмите на действие на активни нискотоксични съединения от растителен и животински произход върху паразитен модел in vivo, предизвикан от представители на род Trichinella

През отчетния период бяха изследвани механизмите на действие на активни нискотоксични съединения върху паразитен модел *in vivo*, предизвикан от представители

на род *Trichinella*. Проведени бяха изследвания на различни етапи от инвазията на паразита. Проследено е действието на природните продукти при безкапсулен представител на рода. Проведен е хистологичен анализ в мускулна тъкан на експериментални животни.

Опитната постановка включва: (**i**) дизайн, изграждане и поддръжка на експериментален трихинелен модел върху мишки; (**ii**) приготвяне на имунологични препарати, при които като имуномодулатор са използвани вещества с № 3,5 и 9; (**iii**) трикратна имунизация (през седем дни) на експерименталните животни (мишки) с имунологични препарати с вещества № 3,5 и 9; (**iv**) инвазиране с безкапсулния вид ***Trichinella pseudospiralis*** на предварително имунизираните опитни животни осем дни след последната имунизация; (**v**) събиране на биологичен материал от експериментално заразените животни за имунологични, биохимични и хистологични анализи и (**vi**) събиране на биологичен материал от експериментално инвазирани с трихинела животни.

Приготвени са проби за хистологичен анализ като биологичният материал е фиксиран в 10% неутрален формалин и е включен в парафинови блокчета. Предстои обработка и тълкуване на получените резултати.

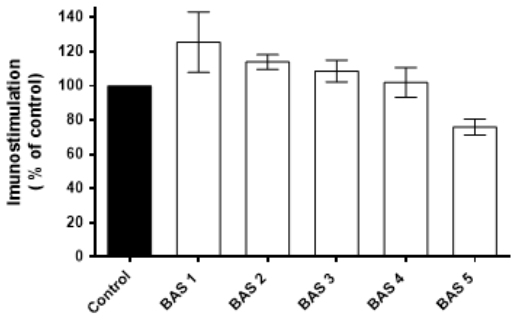


Задача 2.3. Оценка на антивирусната активност на новите средства върху моделни системи. Изследване на механизъм на действие. Изпълнители: ИМолБ - БАН, СУ - БФ

Изследване на имуностимулиращото действие на новите БАВ/системи върху човешка амниотична клетъчна линия WISH, третирана с рекомбинантен човешки интерферон-гама.

Проведени бяха изследвания на имуностимулиращото действие на следните биологично активни съединения (БАВ): дисоцииран на субединици хемоцианин от *Carcinus aestuarii* (CarHc) в дисоциращ буфер; слуз от *Helix aspersa* 1-10 kDa; слуз от *Helix aspersa* 1-3 kDa; слуз от *Helix aspersa* над 30 kDa; хемолимфа от *Helix lucorum* под 10 kDa. От предходните резултати бяха определени стойностите на максималната

нетоксична концентрация (МНК) на изследваните БАВ както следва: 1 и 2 – 1:50, 3, 4 и 5 – 1:10. Тези концентрации бяха използвани при изследването на потенциращото действие на БАВ върху WISH клетъчна линия чрез модифицирано кинурениново есе. Кинурениновият тест, който беше използван, се основава на антипролиферативната активност на hIFNγ и е свързан с индуцирането на ензима индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO), който катализира окислителното разграждане на есенциалната аминокиселина триптофан до N-формилкинуренин. При последващия процес на хидролиза N-формил-кинуренин се трансформира в кинуренин, който след взаимодействие с реактива на Ерлих образува съединение с жълт цвят, с абсорбция при 490 nm. За да изследваме потенциращото действие на БАВ, третирахме WISH клетки (ATCC-CCL25™) с комбинация от БАВ (в подбраните МНК) и ги стимулирахме с hIFNγ, пречистен чрез разработената от екип на ИМолБ методология. Резултатите показаха, че от изследваните вещества, всички освен БАВ 5 проявяват имуностимулиращо действие върху WISH клетъчна линия, като при БАВ 1 (дисоцииран на субединици хемоцианин от *Carcinus aestuarii*) то е най-високо изразено – около 25%. Дисоциираният на субединици хемоцианин от *Carcinus aestuarii* представлява сериозен кандидат за съвместно приложение с антивирусни препарати за стимулиране на Т-клетъчния имунитет при лечение на заболявания причинени от херпесни и други вируси.



Потенциращо действие на изследваните БАВ

Определяне на въздействието на БАВ върху репликацията на щамове на човешките херпесни вируси HHV-1 и HHV-2, включително лекарствено резистентни такива, in vitro. Установяване на стойностите на ED50 и на SI.

Бяха проведени изследвания за цитотоксичност, антивирусна активност и вирусоцидна активност на 3 екстракти от *Astragalus*. Като вирусен модел е използван първи и втори тип на човешки херпес вирус (*HHV-1, щам F*). Използваната клетъчна линия е MDBK. Чрез колориметричен MTT тест на *Mosmann* беше определена

цитотоксичността. Изчислени бяха стойностите на МНК (максималната нетоксична концентрация) и $ЦТК_{50}$ (50%-тната цитотоксична концентрация). Посредством МТТ-базиран колориметричен тест на *Sudo* е изследвана инхибиращата активност и определяна ИК50 (50%-инхибиторна концентрация). Определените стойности на МНК за трите екстракти са сходни, а стойностите на $ЦТК_{50}$ на три от екстрактите варират от 0.91 mg/ml до 3.12 mg/ml. Екстрактът AGO показа най-слаба цитотоксичност и той единствено инхибира репликацията на HHV-1, щам F – 67% *in vitro*. Стойността на $ИК_{50}$ е 0,67 mg/ml.

Изследвани бяха и четири екстракта от ***Gentiana***, пет екстракта от ***Thymus***, хемолимфа от ***Rapana venosa*** 1-10 kDa, хемолимфа от ***Rapana venosa*** 30-100 kDa, хемолимфа от ***Helix lucorum*** под 100 kDa, слуз от ***Helix aspersa*** над 50 kDA, структурна субединица α-HaH от ***Helix apersa***, като вирусен модел е използван първи и втори тип на човешки херпес вирус (*HHV-1, щам F и HHV-2, ацикловир резистентен щам BA*). Потискане на вирусната репликация на HHV-1, щам F беше установено при използването на хемолимфа от ***Rapana venosa*** 1-10 kDa и три екстракта от ***Thymus***. Антивирусно действие не беше установено при HHV-2. Вирусоцидно действие (потискане на инфекциозността на извънклетъчните вириони) на пробите спрямо вирусните модели беше изследвано чрез директен контактен метод и метода на *Reed* и *Muench* за определяне на вирусния титър. Намерено е, че хемолимфата от ***Rapana venosa*** 30-100 kDa и слуз от ***Helix aspersa*** над 50 kDA проявяват добре изразен вирусоциден ефект спрямо HHV-1. Спрямо HHV-2 ясно изразен вирусоциден ефект проявяват слуз от ***Helix aspersa*** над 50 kDA и структурната субединица α-HaH от ***Helix apersa***.

Работен пакет 3 **Изследване на създадените нискотоксични биологично активни средства/системи на бактериални *in vitro* системи**
***Ръководител на работния пакет*: чл.-кор. Христо Найденски**

Задача 3.1. Оценка на антибактериална активност на нови компоненти срещу Грам (+) и Грам (-) бактерии, които са високо-рискови патогени и са развили множествена лекарствена резистентност. Изпълнители: ИМикБ-БАН, МУ-Пловдив, СУ-БФ, МУ-ФФ-София

Получените метанолови екстракти от семена на ***Гинко билоба*** бяха изпитани за наличие на антибактериална активност върху 6 щама Грам (+) и 6 щама Грам (-)

бактерии. Слаб инхибиращ ефект беше установен при 9 щама с минимални инхибиращи концентрации, както следва: *Bacillus subtilis ATCC 6633* – 0,875 mg/ml, *Bacillus cereus* – 0,875 mg/ml, *Bacillus amyloliquefaciens* – 1,75 mg/ml, *Staphylococcus aureus ATCC 25923* – 0,875 mg/ml, *Enterococcus faecalis* – 3,5 mg/ml, *Micrococcus luteus* – 3,5 mg/ml, *Salmonella enteritidis* – 1,75 mg/ml, *Escherichia coli ATCC 8739* – 1,75 mg/ml, *Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027* – 1,75 mg/ml. Тези резултатите показват, че е необходимо допълнително фракциониране и пречистване на екстракта за отстраняване на инертни компоненти, което би подобрило резултатите за противогъбична и антибактериална активност при влагане на екстракта в полимерни матрици като доставящи средства на биологично активни вещества.

Изследвана е метаболитната активност на *Staphylococcus aureus ATCC 29213*, *Enterococcus faecalis ATCC 29212*, *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853*, *Escherichia coli ATCC 35218*, метицилин-резистентен *S. aureus NBIMCC 8327 (MRSA)*, *Streptococcus pyogenes SAIMC 10535*, *Yersinia enterocolitica SAIMC 864 O:3* и *Candida albicans SAIMC 562*, след въздействие с масло от български риган (***Origanum vulgare***), включено в наночастици от хитозан чрез МТТ тест. Моделът на *Lambert – Pearson* (*LP*) беше избран за описване на експерименталните данни. В този случай предположението на модела е, че маслото влияе върху активността на микроорганизмите на популационно ниво. Анализът на данните за инхибирането на дихателната активност на тестваните осем щама за приложените еднакви дози показва, че наноразмерната система, натоварена с масло от риган по-ефективно инхибира метаболитната активност на третираните патогени. Щамът *P. aeruginosa* е най-устойчив на въздействието и на двете форми риган. Най-чувствителен към чистото масло е щамът *Y. enterocolitica*, а към наноразмерната система - *C. albicans*. Наноразмерната система, натоварена с масло от риган по-ефективно инхибира метаболитната активност на двата стафилококови щама, докато при щамовете *E. faecalis* и *S. pyogenes* се наблюдава обратната тенденция. Най-чувствителни към наноразмерната система с масло от риган са метицилин резистентните стафилококи, а най-устойчиви са стрептококите. Избраният модел (*LP*) има отлични описателни характеристики на процеси, свързани с инхибиране на метаболитната бактериална активност на популационно ниво и може успешно да се адаптира и използва за широк кръг от вещества за третиране, както и за различни щамове патогени. Най-чувствителен към маслото от риган, включено в наночастици от хитозан е щамът MRSA, а най-устойчиви са стрептококите от вида *S. pyogenes*. Наноразмерната система от хитозан с

включено масло от български риган е с по-висока антиметаболитна активност от чистото масло при 6 от тестваните осем щама, докато при останалите два (ентерококи и стрептококи) се наблюдава обратната тенденция. Също така, стойностите на МИК след приложение на наноразмерната система, натоварена с масло от риган са по-ниски от тези на чистото масло от риган, но при тях дехидрогеназната активност на бактериите е по-висока, отколкото при корелацията МИК-ДЕНА (чисто масло).

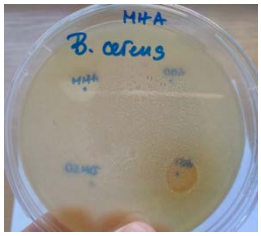
(**МИК (MIC) е минимална инхибираща концентрация, а МБК е минимална бактерицидна концентрация*)

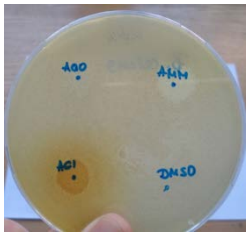
Проведен беше скрининг върху биофилм-образуването по протокола на *Stepanović* на следните видове микроорганизми: *S. aureus, E. faecalis, P. aeruginosa, E. coli,* MRSA, *S. pyogenes, Y. enterocolitica* и *C. albicans.* От проведените изследвания се установи, че от всички тествани микроорганизми единствено *E. coli* и *Y. enterocolitica* не образуват биофилми, поради което те не бяха използвани като моделни видове в бъдещи проучвания. Експериментите продължиха с изпитване ефекта на масло от български риган и масло от български риган, което е включено в наночастици от хитозан върху биофилм-образуването на избраните видове микроорганизми. От получените експериментални данни се установи, че маслото от български риган самостоятелно и включено в наночастици от хитозан не влияе върху биофилм-образуването на *E. faecalis* и *S. pyogenes.* Биофилм-образуването на *P. aeruginosa* се инхибира единствено след третиране с чисто масло от риган. Формирането на биофилм от *S. aureus* е инхибирано след третиране с масло от български риган, включено в наночастици от хитозан, а биофилм-образуването на *C. albicans* е потиснато след третиране с чисто масло от риган и по-слабо след третиране с масло, включено в наночастици от хитозан. Получените данни сочат, че маслото от български риган, натоварено в наночастици от хитозан проявява по-силен антимикробен ефект от чистото масло, като последното повлиява в по-голяма степен биофилм-образуването на MRSA и *P. aeruginosa.* Получените резултати определят и двете изследвани форми от масла като перспективни за бъдещи по-задълбочени проучвания.

Известно е, че след изгаряния, щамове от вида *S. aureus* колонизират раневата повърхност на кожата, независимо че са налични и като нормална микрофлора. Възможно е този феномен да бъде последван от вторична колонизация на повърхността на раната от изгаряне от други бактериални и гъбични видове, включително *P. aeruginosa* и *C. albicans*. Ето защо, бяха проведени изследвания за кожно раздразнение върху

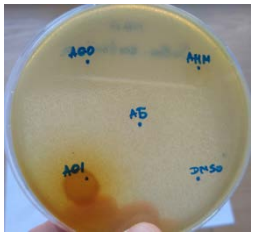
животински модел по ISO 10993-10:2013, с цел потенциалното разработване на препарат, съдържащ масло от риган, който да оказва благоприятен ефект при лечението на кожни лезии, причинени от изгаряния, съпроводени с бактериални или гъбични инфекции. За целта използвахме здрави, полово-зрели мъжки и женски зайци с ненаранена интактна кожа. Маслото от български риган беше приложено в концентрация равна на МИК (0,1%) и десетократно по-висока концентрация (1%), докато маслото, включено в наночастици от хитозан, беше нанесено в концентрации 0,01% и 0,1% върху депилирани участъци на гърбовете на животните. Съгласно международно установеният стандарт бяха проведени две експозиции с тестваните масла, като резултатите са отчетени на 24, 48 и 72 час. Изчислени бяха първичният и вторичен индекс на дразнене на база отчетените кожни промени (еритема и едема). Установено е, че изследваните проби в съответните разреждания със слънчогледово олио не предизвикват кожно раздразнение, в сравнение с положителната контрола, която предизвика добре изразена еритема и лек оток. Получените данни ни дават основание да продължим експериментите си с проучване механизма на действие (кворум-сенсинг) на маслото от български риган и маслото от български риган, включено в наночастици от хитозан върху генната експресия, отговорна за адхезията и биофилм-образуването при стафилококи.

Проведен е първоначален скрининг за наличие на антибактериална активност на изолираните сапонини (AGO-TE, AMM-TE и AGI-TE) от ***род Astragalus*** спрямо *E. faecalis, B. cereus, E. faecium, P. acnes, S. enterica*. Въз основа на получените резултати бяха определени веществата AGI и AMM срещу тест-микроорганизмите, тъй като при тях се наблюдаваха минимални зони на инхибиране. Веществото AGO отпадна, поради липсата на ефект върху работните тест-култури. Получените стойности на клетъчна плътност и последвалите посевки в петрита с МПА веднага след това, потвърждават първоначалните ориентировъчни резултати, че дадените растителни екстракти нямат антимикробен ефект срещу тест-културите или имат слаб бактериостатичен такъв.



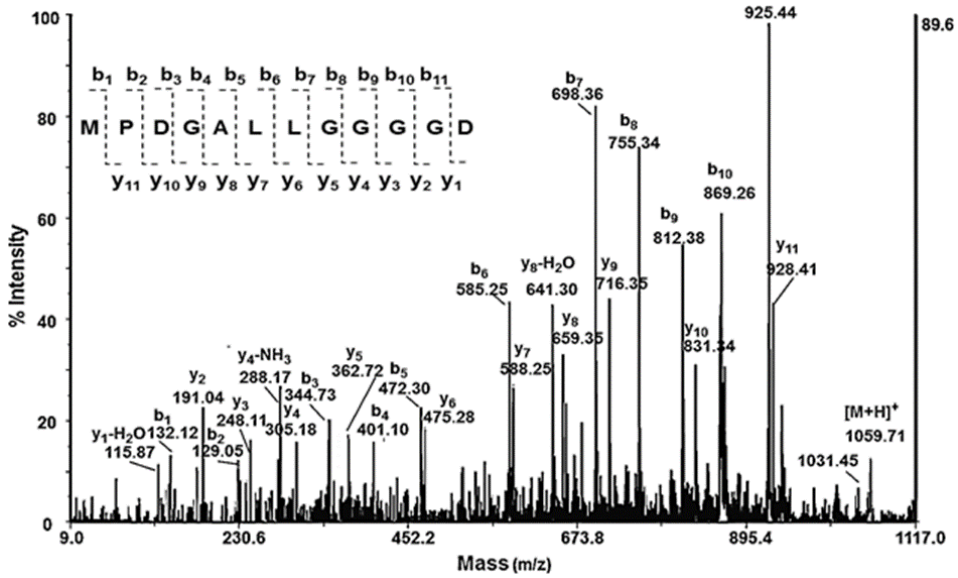






Задача 3.3. Установяване на съответствие между първичната и вторичната структура и потенциала на пептидите за инхибиране на бактериалната активност.
Изпълнители: ИМикБ-БАН, ИОХЦФ-БАН

Откриването на нови антимикробни съединения (АМС) от природни източници е от голямо значение за общественото здраве, тъй като тези молекули са фармакологични кандидати поради тяхната ефективна антимикробна активност и ниска степен на резистентност. Изолирани, пречистени и анализиран чрез MALDI-TOF/TOF и LTQ-Orbitrap масспектрометрия са седем фракции от слузта на градински охлюв ***Helix aspersa***, съдържащи съединения с M_w <3 kDa, <10 kDa, <20 kDa,> 20 kDa, и между 3-5 kDa, 5-10 kDa и 10-30 kDa.



Молекулните маси на пептидите (във фракция с M_w <3 kDa) са определени като $[M+H]^+$ в диапазона между 600-2500 Da, от MALDI-TOF-MS анализ, проведен в положителен режим на йонизация, при дължина на вълната на лазера 355 nm. Аминокиселинната последователност (АКП) на пептидите е определена чрез *de novo* секвениране на протонираните молекулни йони $[M+H]^+$, чрез MALDI-TOF-MS/MS и LC-ESI-MS/MS анализи на LTQ Orbitrap XL. В резултат **са идентифицирани първичните структури на 16 нови, богати на глицин и пролин пептиди**, с молекулни маси между 1000 - 3000 Da, чрез *de novo* MS/MS секвениране. Анализите, проведени чрез ExPASy ProtParam, показват, че фракцията на слуз с M_w <3kDa съдържа както катионни, така и анионни пептиди.

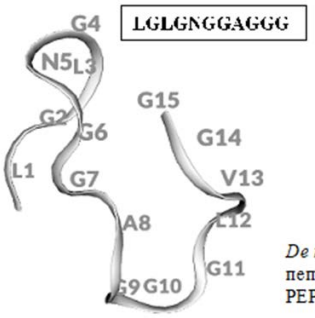
Проведеното налагане на аминокиселинната последователност на пептидите от слузта на градински охлюв *H. aspera*, разкри висока хомоложност (над 70%) с известни

антимикробните пептиди (АМП) и потвърди, че идентифицираните нови пептиди принадлежат към това семейство. Така например: пептидите № 5 и 6 показват ~ 72% хомология с *Ctenidin 1* и *Ctenidin 3*, а пептидите № 9, 10, 13 и 17 имат около 73-76% хомология с двете изоформи на антимикробния пептид - *acanthoscurrin*. Повечето от идентифицираните пептиди се характеризират с амфипатична структура и показват хидрофобни повърхности. Този факт е предпоставка за нарушаване на биологичните мембрани и директен клетъчен лизис. Известно е, че катионните АМП-ди убиват микробите чрез механизми, които включват предимно взаимодействие между положително заредените остатъци от пептида и анионните компоненти на мембраните на целевите клетки. Тези взаимодействия могат да доведат до редица ефекти, включително мембранна пропускливост, деполяризация, изтичане или лизис, което води до клетъчна смърт. Като цяло катионните антимикробни пептиди действат върху мембраната на микроорганизмите чрез електростатична разлика, но има АМП-ди, които проникват през мембраната и могат да взаимодействат с рибозоми, протеини или нуклеинови киселини.

Пептидите (№ 8, 9, 11, 14, 15) принадлежат към анионните антимикробни пептиди (AAMPs), които през последното десетилетие все по-често се идентифицират в различни организми – от безгръбначни до гръбначни видове, включително и растения. Обикновено ААМП проявяват антибактериална активност, но редица от тях са мултифункционални, като при много от тях е установена противогъбична, противоракова, невропептидна активност. Ето защо, много от тях имат потенциала да се превърнат в конвенционални антибиотици. AAMP обикновено приемат амфифилни структури. За редица от тези пептиди посттранслационните модификации са от съществено значение за антимикробната активност. Мембранното взаимодействие, изглежда ключ към антимикробната функция на AAMP. Антимикробните механизми, предложени за тези пептиди, включват образуване на тороидни пори и взаимодействие с мембрана, съгласно модела на *Shai-Huang-Matsazuki*. Проведеният анализ показва, че повечето пептиди са богати на аминокиселинни остатъци като Gly, Pro, Leu, Val, Trp, Asp, Phe, и Arg, които са характерни за антимикробните пептиди (АМП). Пептидите, с високо съдържание на остатъци от Pro, Gly и Arg, са важна група от АМП, активни предимно срещу грам-отрицателни бактерии. Те могат да се свързват с протеини на топлинен шок и да инхибират синтеза им в клетките. Намерени са 12 пептиди последователности, които включват от 1 до 3 Pro остатъци в полипептидната верига. При девет пептида, Pro

остатъците са включени в С-крайния участък на полипептидната верига и само при 5 пептида - Pro е разположен в N-крайния регион. Два пептида съдържат пролинови остатъци както в N-, така и в С-края на полипептидна верига, а при пептиди (№ 8, 15) е установен пролинов остатък разположен в средата на полипептидната верига. Пептиди № 6, 10, 13, 16 и 17 имат високо съдържание на Gly и Leu остатъци и могат да бъдат причислени към нов клас АМП, богати на Gly/Leu. Установена е висока хомология между аминокиселинните последователности на пептиди № 2, 13, 14 и 16 и антимикробния пептид - лептоглицин (GLLGGLLGPLLGGGGGGGGGGLL), който инхибира растежа на Грам (-) бактерии, като *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli* и *Citrobacter freundii*, но не показва антимикробна активност срещу Грам (+) бактерии. Проведеният анализ (в BLAST) показа, че пет пептида (№ 1-4, 8) демонстрират висока хомология (между 60 и 100%) с хемоцианини, изолирани от охлюви *Helix aspersa, Helix pomatia* и *Helix lucorum*. Вероятно протеолитичните процеси протичащи в организма на охлюва са довели до появата на тези пептиди в слузта. Това предположение е подкрепено от факта, че по-голямата част от познатите АМП-ди, произхождат от по-големи протеини. Редица изследвания потвърждават, че биологично активни протеини, като хемоцианини или хемоглобини, могат да бъдат източник на биологично активни съединения с по-ниска молекулна маса, включително и АМП-ди.

Много АМП-ди са неструктурирани в свободен разтвор и се нагъват в окончателната си конформация при контакт с бактериалните мембрани. Като цяло тези пептиди могат да постигнат различни конформации като α-спирали, β-листове, смесени конформи, контури и разширени структури. Получените *de novo* 3-D структури на пептиди, чрез програмата PEP-FOLD3, показват, че преобладават пептиди с неподредени структури, някои пептиди имат спирални структури, а само при някои - смесени структури в полипептидната верига.



De novo 3-D прогнозиране на структурата на пептид GLGNGGAGGGLVGG (№5), чрез PEP-FOLD3.

Работен пакет 4 **Изследване *in vitro* и *in vivo* ефективността на създадените нискотоксични биологично активни средства/системи срещу невродегенеративни заболявания**

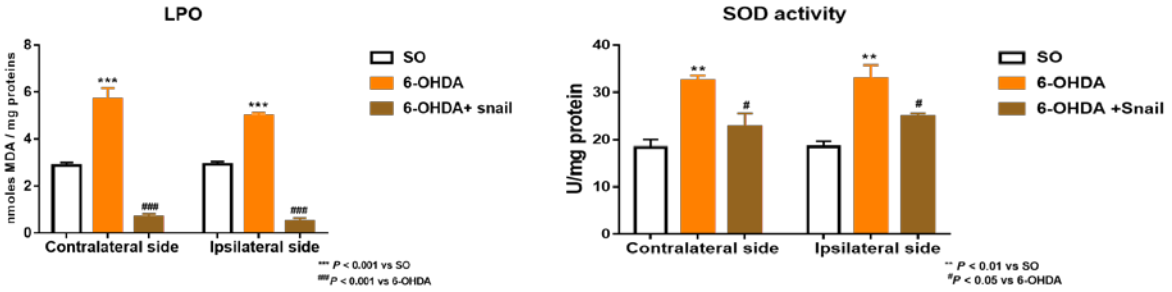
***Ръководител на работния пакет*: доц. д-р Любка Танчева**

Задача 4.2. Оценка на нови биологично активни средства и техни комбинации срещу болестта Паркинсон. Изпълнители: ИНБ-БАН, ИОХЦФ-БАН, МУ-Пловдив

Експерименталният модел на болестта на Паркинсон беше осъществен посредством еднократно стереотаксично унилатерално инжектиране на невротоксина 6-хидроксидопамин (6-OHDA) в доза 2 µl/10 µg директно в десния стриатум на опитни животни плъхове. Посредством този токсин се извършваше лезия на нигростриаталните допаминергични неврони. Освен чрез поведенчески тестове (брой на апоморфиновите ротации, брой на паданията от лоста, изследване на нарушенията в обучението и запаметяването), експерименталният модел на Паркинсоновата болест беше верифициран биохимично и хистологично.

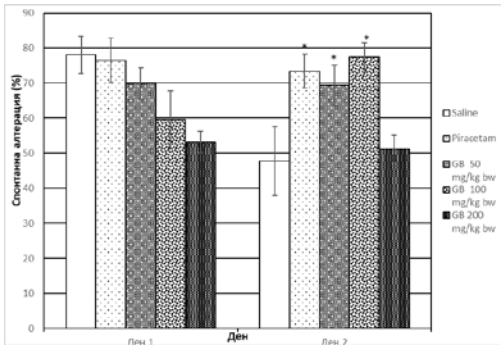
Групите третирани с невротоксина 6-OHDA бяха сравнявани с фалшиво оперирани групи, третирани само с физиологичен разтвор в десния стриатум. Пресният ***екстракт от охлюви*** се въвеждаше през устата в продължение на 13 дни при плъховете с експериментален модел на болестта на Паркинсон в доза 0.5 ml/100 g телесно тегло - превантивно в продължение на 6 дни преди стереотаксичните операции и терапевтично в продължение на 7 дни след тези операции. Поведенческите тестове се провеждаха на първата, втората и третата седмица след лезията. Двадесет и четири часа след приключване на последните поведенчески тестове, животните бяха декапитирани. В мозъчни хомогенати на лявата и дясна половина бяха определяни допаминовите нива и основните параметри на оксидативния стрес – липидна пероксидация, нива на глутатион и антиоксиданстния ензим супероксиддисмутаза. Взет беше материал за хистологично изследване на морфологичните мозъчни промени в стриатума. Резултатите от поведенчески тестове показаха, че при третираните с невротоксин групи има значително нарушение в двигателната координация и в процесите на обучение и запаметяване. Прилагането на екстракта от охлюви оказва благоприятен ефект върху паметта и координацията на движенията при паркинсоницте. Тези промени бяха придружени от значително понижение на липидната пероксидация, което е индикатор за намаляване в степента на увреждане на клетъчната мембрана в мозъка и възстановяване активността

на антиоксидантния ензим супероксиддисмутаза. В заключение, екстрактът от охлюви оказа благоприятен ефект при експериментален модел на болестта на Паркинсон, който беше потвърден както поведенчески, така и биохимично.

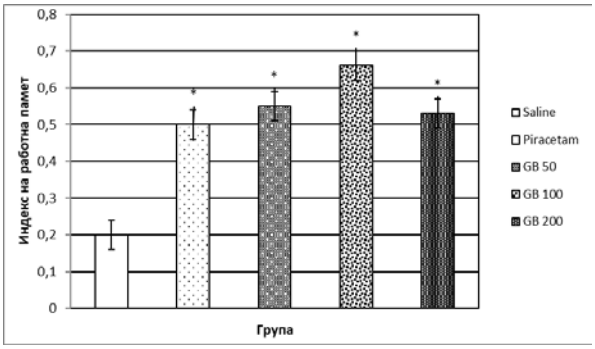


През отчетния период бяха обработени данните от проведените през юни 2019 г. експерименти с плъхове, които бяха третирани в продължение на 1 месец с различни дози екстракт от семена на ***Гинко*** – 50, 100 и 200 mg/kg и подложени на различни тестове за оценка на паметовите и обучителни функции. За сравнение беше използван добре известния ноотропен медикамент Пирацетам. Контролна група животни беше третирана само с физиологичен разтвор. Животните, третирани с пирацетам сигнификантно повишиха спонтанната алтерация при теста за памет спрямо групата с физиологичен разтвор ($p < 0.05$). При сравнение на трите опитни групи с чистата контрола, само групите с двете по-ниски дози от екстракта на ***Гинко билоба*** (50 и 100 mg/kg) достоверно увеличиха спонтанната алтерация при теста за паметови следи ($p<0.05$).

Y-лабиринтът може да се прилага за оценка на краткосрочната памет и общата локомоторна активност. Известно е, че спонтанните алтерации са показател за пространствената разпознавателна памет. Нашите резултати показаха подобряването ѝ при двете по-ниски изследвани дози от екстракта в сравнение с чистата контрола. Нещо повече, ефектът им е съизмерим с този на позитивната контрола с пирацетам. Групата, третирана с пирацетам повиши сигнификантно индекса на работна памет ($p < 0.05$) при сравнение с контролната група. Трите експериментални групи с екстракт от семена на ***Гинко билоба*** достоверно увеличиха индекса на работна памет при сравнение с групата с физиологичен разтвор ($p < 0.05$). При сравнение между опитните групи сигнификантност не беше достигната. Т-лабиринтът е метод за изследване на пространствената работна памет. Получените от нас резултати показват подобрение в индекса на работна памет и при трите изследвани дози от екстракта от ***Гинко билоба*** спрямо контролата.

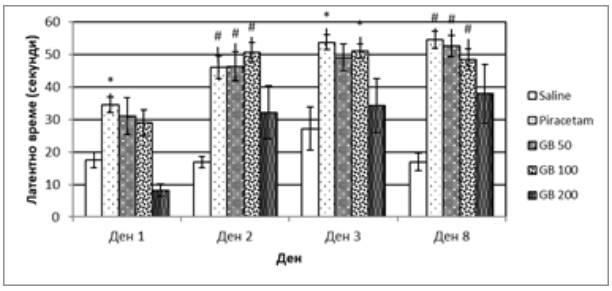


Ефект на екстракт от семена на Гинко билоба върху спонтанната алтерация при Y-лабиринт при плъхове

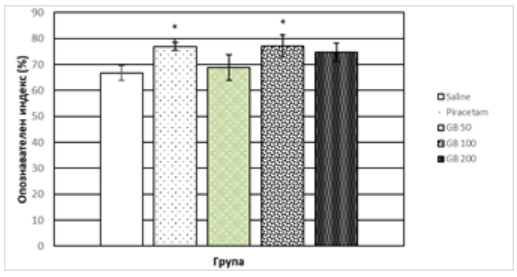


Ефект на екстракт от семена на Гинко билоба върху пространствената памет при Т-лабиринт при плъхове

Животните, получили пирацетам в доза 600 mg/kg достоверно удължиха времето за реакция през двата дни на тренировки (респ. $p < 0.05$ и $p < 0.01$) и при тестовете за памет (респ. $p < 0.05$ и $p < 0.01$) в сравнение с чистата контрола. Животните, третирани с най-ниската доза от екстракта на ***Гинко билоба*** (50 mg/kg) сигнификантно удължиха времето за реакция през втория ден на обучение ($p < 0.01$), както и при теста за дългосрочна памет ($p < 0.01$). Плъховете, получили средната доза от екстракта достоверно увеличиха латентното време на втория тренировъчен ден ($p < 0.01$), при теста за краткосрочна ($p < 0.05$) и дългосрочна памет ($p < 0.01$). Животните, получили екстракт от ***Гинко билоба*** в най-високата доза не промениха достоверно времето за престой върху платформата както по време на обучението, така и при двата теста за памет. Поведенческите реакции при този тест се опосредстват от хипокампа. Вероятно наблюдаваният подобряващ паметта ефект на екстракта се дължи на стимулиране на дългосрочното потенциране в хипокампа. Животните, третирани с пирацетам в доза 600 mg/kg сигнификантно увеличиха опознавателния индекс спрямо контролата ($p < 0.05$). От трите опитни групи само животните, третирани със средната доза от екстракта (100 mg/kg) достоверно повишиха опознавателния индекс ($p < 0.05$) в сравнение с чистата контрола



Ефект на екстракт от семена на Гинко билоба върху латентно време за реакция при step-down тест при плъхове



Ефект на екстракт от семена на Гинко билоба върху опознавателния индекс при опознавателен тест при плъхове

Работен пакет 5 **Изследване на антитуморната активност на създадените нискотоксични биологично активни средства/системи**

***Ръководител на работния пакет*: доц. д-р Ива Угринова**

Задача 5.1. Определяне на антинеопластичната активност в *in vitro* и *in vivo* моделни системи на различни малигнени заболявания при човека. Изпълнители: ИМолБ-БАН, ИОХЦФ-БАН, МУ-ФФ-София

През първата година на проекта описахме пилотни експерименти свързани с изследване на антитуморния ефект на различни природни продукти от охлюви (***Helix aspersa, Helix lucorum***), както и от род ***Rapana venosa.*** Тези изследвания се задълбочиха и продължиха и в настоящия отчетен период, като тук вече се опитваме да проучим механизмите на действие на избрани фракции. Спряхме се на *in vitro* изследване на антитуморната активност на биологично активни съединения, изолирани от хемолимфа на морския охлюв *R. venosa* и от слузта на градински охлюв *Helix aspersa,* върху панел човешки клетъчни линии от рак на гърдата, които се различават по произход и по генетичен профил – **MCF-10A** (неракова, изолирана от доброкачествена мастопатия), **MCF-7** (ракова с функционален p53) и **MDA-MB-231** (ракова, силно агресивна, в която p53 е мутирал и е функционално неактивен). Ракът на гърдата е най-често срещаното злокачествено заболяване сред жените. Установена е намалена клетъчна жизне-способност както на MCF-7, така и на MDA-MB-231 клетъчните линии от рак на гърдата, след третиране с ниски концентрации на две фракции от слузта на *H. aspersa* с M_w над 20 kDa и над 50 kDa, фракция с M_w между 50 - 100 kDa от хемолимфа от морския охлюв *R. venosa* и две изоформи (RvH1 и RvH2) на хемоциани от *R. venosa*. Установена е по-ниска цитотоксичност при третиране на MCF-10A клетки, които обикновено се използват като модел на нормални клетки на гърдата. Най-висок антипролиферативен ефект е установен при третиране на туморните клетъчни линии с фракция с Mw между 50-100 kDa, изолирана от хемолимфата на *R. venosa*. Химиотерапевтиците цис-Платина и Тамоксифен са използвани самостоятелно и в комбинация с активните фракции от хемолимфа на *R. venosa* и слузта на *H. aspersa*, с цел намиране на синергичен ефект на действие, срещу тестваните туморни клетъчни линии. Резултатите разкриха, че най-висок синергичен антипролиферативен ефект се наблюдава при третиране на MDA-MB-231 (тройно отрицателна клетъчна линия на рак на гърдата) с активната фракция между

50-100 kDa от хемолимфа на *R. venosa* и RvH1 в комбинация с cis-Pt. Микроскопските наблюдения върху MDA-MB-231 клетки, показват значително нарушена морфология след третиране с посочените комбинации в сравнение с контролните клетки или третирани само с RvH1. Тези резултати дават важна информация за по-нататъшни изследвания на противораковата активност на нови биологично активни съединения от хемолимфа на морския охлюв *R. venosa*. Въз основа на получените резултати от проведените анализи, високият анти-пролиферативен ефект на фракцията с M_w между 50-100 kDa, изолирана от хемолимфата на *R. venosa,* най-вероятно се дължи на L-амино-киселинна оксидаза (LAAO) с M_w около 60 kDa. Известно е, че този протеин принадлежи към семейството на оксидоредуктази и участва в окислително-редукционни процеси, освен това проявява различни биологични активности, включително цитотоксични, антибактериални, антивирусни и антипаразитни, както и ефекти на агрегация на тромбоцитите. Анти-пролиферативното му действие е свързано с индуцииране на апоптоза.

През първата година на Програмата беше установено, че фракцията, съдържаща биоактивни компоненти с M_w между 50-100 kDa, изолирана от хемолимфата на морски охлюви *R. venosa*, проявява най-висока антитуморна активност и срещу клетъчна линия HELA, получена от епителиоиден карцином на шийката на матката и клетъчна линия A375, изолирана от пациент със злокачествен меланом. С цел да се обясни механизма на действие на тази фракция срещу посочените две ракови клетъчни линии е проведен протеомен анализ на едно- и дву- димесионална електрофореза на клетъчните протеини, изолирани от линия HELA и линия A375, преди и след третиране. Идентифицирани са клетъчните протеини от ракова линия HELA преди и след третиране с активната фракция с M_w между 50-100 kDa, изолирана от хемолимфата на *R. venosa.* Протеините са идентифицирани от еднодименсионалната електрофореза чрез протеомен анализ, чрез налагане на съответните пептидни секвенции в BLAST. В ход е протеомен анализ на 2-D електрофорезата на клетъчни протеини от ракова линия HELA преди и след третиране с активната фракция от хемолимфа на *R. venosa*, с M_w между 50-100 kDa.

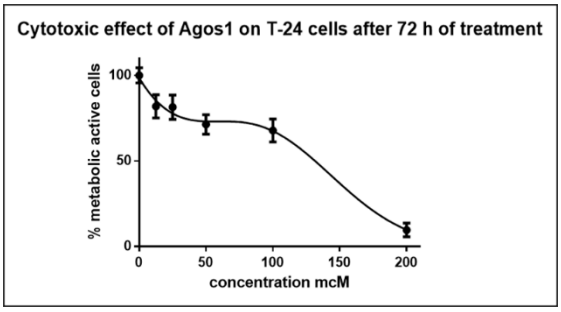
Противотумната активност на хемоциани от морските охлюви *Rapana venosa* (RvH), гигантска мида *Megathura crenulata* (KLH) и градински охлюви *Helix lucorum* (HlH) и техните изоформи бяха изследвани *in vitro* на постоянни клетъчни линии на рак на пикочния мехур. Различни форми получени от RvH, KLH и HlH са анализирани *in vitro* срещу постоянна клетъчна линия на рак на пикочния мехур T24 и нормалната

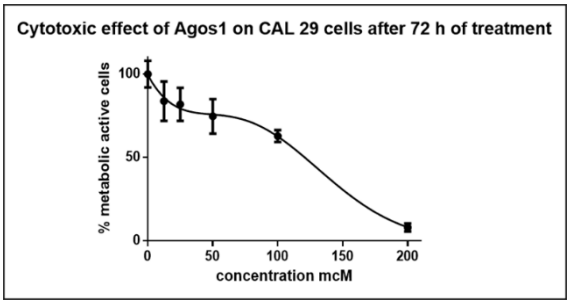
уротелиална клетъчна линия HL 10/29 в сравнение с доксорубицин. Получените резултати показват, че човешката туморна клетъчна линия T24 е чувствителна към действието на тестваните изоформи и гликозилирани FUs на тези хемоцианини. След инкубацията с изоформи βc-HlH и RvH1 и гликолизираните функционални единици βc-HlH-h и RvH-e е установено, селективно инхибиране на растежа на T24 клетки в зависимост от дозата и времето. Резултатите от флуоресцентните микрографии показват, че липсват апоптотични или некротични изменения на нормалната уротелиална клетъчна линия HL 10/29. Функционалната единица (ФЕ) βc-HlH-h демонстрира най-висок антипролиферативен ефект (подобно на доксорубицина), при това се наблюдават предимно апоптотични и по-малко некротични изменения в туморните клетки T24. С помощта на протеомен анализ са идентифицирани седем надолу-регулирани и три нагоре-регулирани протеини, които могат да бъдат свързани с пътя на апоптозата. Настоящото изследване е първият доклад за промяна на експресията на протеини в клетките на T24 на карцином на пикочния мехур под влиянието на функционалната единица βc-HlH-h. Това вероятно се дължи на специфичните олигозахаридни структури, богати на метилирани хексози. 3D-структурният модел на ФЕ βc-HlH-h показа, че потенциалните 3 центрове на гликозилиране, както и въглехидратните вериги са изложени на повърхността на функционалната единица. Това е от съществено значение за осъществяване на взаимодействие с въглехидратните остатъците, изложени на повърхността на туморните клетки и наблюдаваната антитуморна активност.

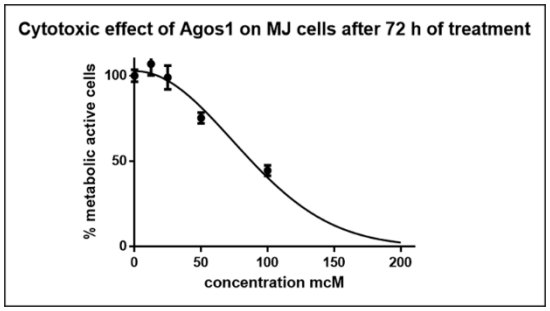
Изолираните два сапонина (*Agos 1* и *Agos 9*) от надземната част на ***Astragalus glycyphyllos*** бяха тествани върху клетъчни линии от рак на пикочния мехур (T-24 и CAL29) и от кожен Т-клетъчен лимфом (CTCL) (MJ от кожната форма *Mycosis fungoides* и *HuT-78* от пациент със синдром на *Sézary*). Двете клетъчни линии от рак на пикочния мехур експресират ксенобиотичната помпа, отговорна за множествена лекарствена резистентност, означавана като MDR1 или gp170. Клетките CAL29 се отличават с много по-високи нива на този трансмембранен протеин в сравнение с T-24.

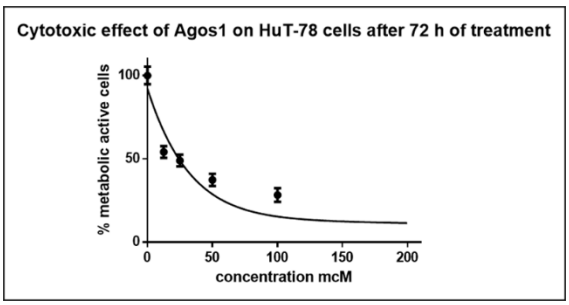
Намерено беше, че съединението Agos 1 показва концентрационно зависим противотуморен ефект при клетки T-24. Определената IC50 е 93 μM. Кривата има характерен двустъпален ход, който може да се обясни с действието на MDR1, което осигурява експорта на съединението от туморните клетки. Също така, Agos 1 показа концентрационно зависим противотуморен ефект и при клетки CAL-29. Определената IC50 е 95 μM. Кривата има характерен двустъпален ход, който може да се обясни с

действието на MDR1, което осигурява експорта на съединението от туморните клетки. Нещо повече, Agos 1 показа концентрационно зависим противотуморен ефект и при клетки MJ. Определената IC50 е 83 µM. При двете клетъчни линии определените от експерименталните криви IC50 стойности са относително високи и могат да бъдат обусловени от факта, че Agos 1 е субстрат на MDR1. Съединението Agos 1 показа и концентрационно зависим противотуморен ефект при клетки HuT-78. Определената IC50 е 20 µM.

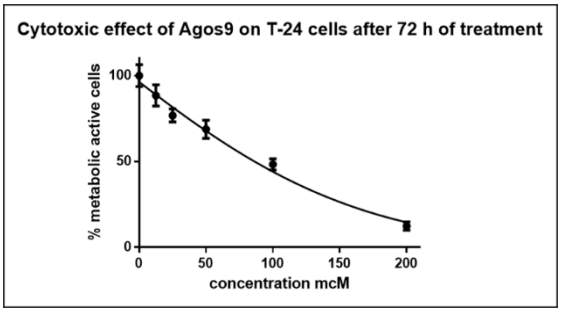


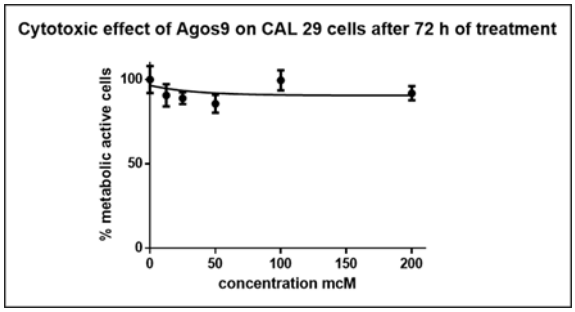


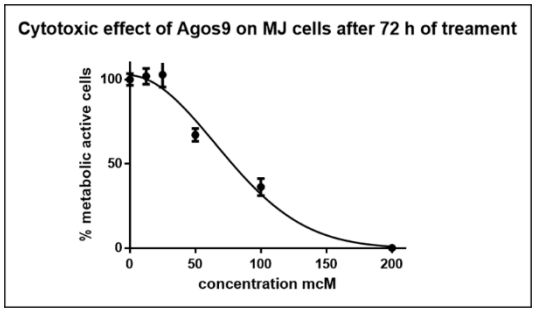


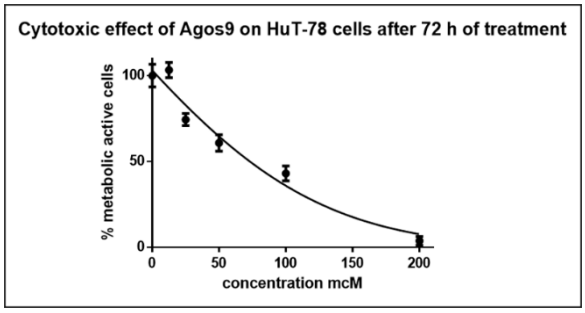


Намерено беше, че съединението Agos 9 показва концентрационно зависим противотуморен ефект при клетки Т-24. Определената IC50 е 79 µM. Спрямо клетки от рак на пикочния мехур CAL-29 обаче, Agos 9 няма противотуморна активност. Ясно се вижда, че Agos 9 показва концентрационно зависим противотуморен ефект при клетки MJ с IC50 е 73 µM и концентрационно зависим противотуморен ефект при клетки MJ с IC50 е 66 µM.







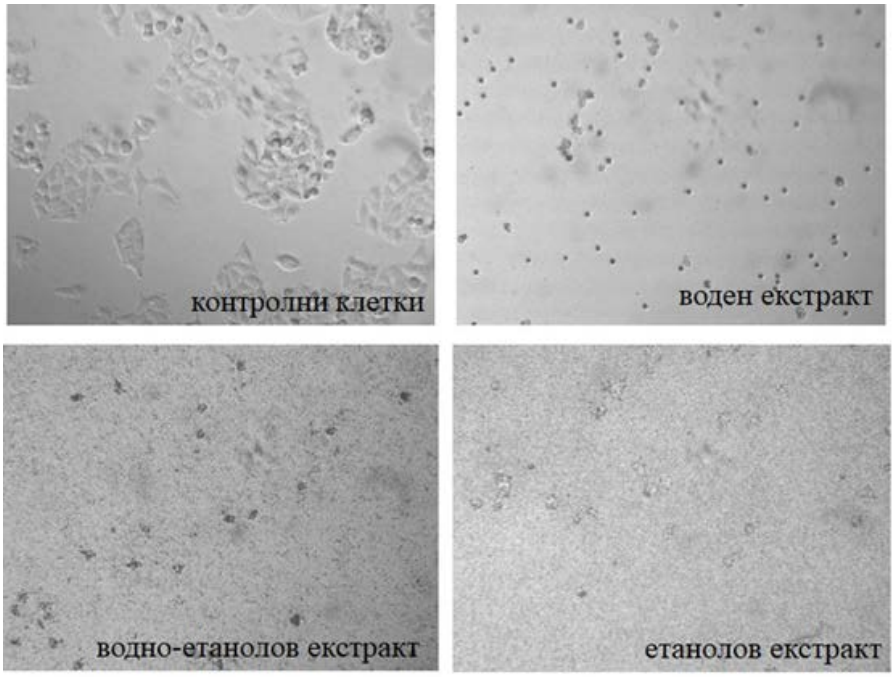


Получените експериментални данни показват сходна за двете съединения антинеопластична активност при моделите на двете заболявания – рак на пикочния мехур и кожен Т-клетъчен лимфом. AgoS 1 и 9 вероятно са субстрат на MDR1 като в случая със съединението AgoS9 при клетъчна линия CAL29 от уротелен карцином не може да се определи IC50 в изследвания обхват от концентрации под 200 µM. Най-ниската определена от експерименталната крива стойност на IC50 се отнася за съединение AgoS1 при клетки HuT-78 от синдром на Sézary (левкемична форма на кожен Т-клетъчен лимфом). Двете съединения представляват интерес като потенциални компоненти от терапията на кожния Т-клетъчен лимфом и в много по-малка степен на рака на пикочния мехур. Необходимо е да продължат изследванията на по-доброто като антинеопластична активност съединение AgoS1 за хемолитична активност и обща токсичност.

За изследване на противораковото действие на няколко вида дървесни гъби, които се срещат в природен парк Витоша, а именно: *Trametes versicolor*; *Lenzites betulina*; *Fomes fomentarius*; *Piptoporus betulinus*; *Fomitopsis betulina*, чрез накисване и запарка бяха приготвени водни, алкохолни и водно-алкохолни екстракти като неселективни цялостни екстракти. Водата е най-обичайният разтворител във фармацията за получаването на фитофармацевтични продукти, тъй като не променя качествата на природните продукти и се понася добре от тъканите. Във водата се разтварят обаче само водоразтворимите активни вещества, при pH, близко до неутралното (киселини, основи, соли, захари, феноли и полифеноли, аминокиселини, гликозиди, смоли, танини, ензими). Алкохолът от своя страна има добър капацитет на разтваряне на органичните и минералните вещества, разтваряйки, в малка или голяма степен алкалоиди, гликозиди, полифеноли, флавоноиди, летливи масла, танини и смоли. Тъй като алкохолът сам по себе си притежава фармакодинамичен ефект, тестовете с алкохолни и водно-алкохолни екстракти се съпровождат от контролни експерименти с етилов алкохол.

Изследвано беше въздействието на изброените извлеци върху панел от ракови клетъчни линии от рак на кожата (меланома) – A375, A375 KRAS, Hs 895, Hs 895.T и рак на млечна жлеза – MDA-MB231. Проведени са експерименти, чрез които беше определена половината ефективна доза IC50 на изброените извлеци от 5-те вида дървесни гъби. Намерено е, че и трите извлека от дървесната гъба *Piptiporus betulinus* притежават най-изразено антитуморно действие при всички изследвани ракови линии. Изследвано е и цитотоксичното действие на всички изследвани дървесни гъби като половината ефективна доза IC50.

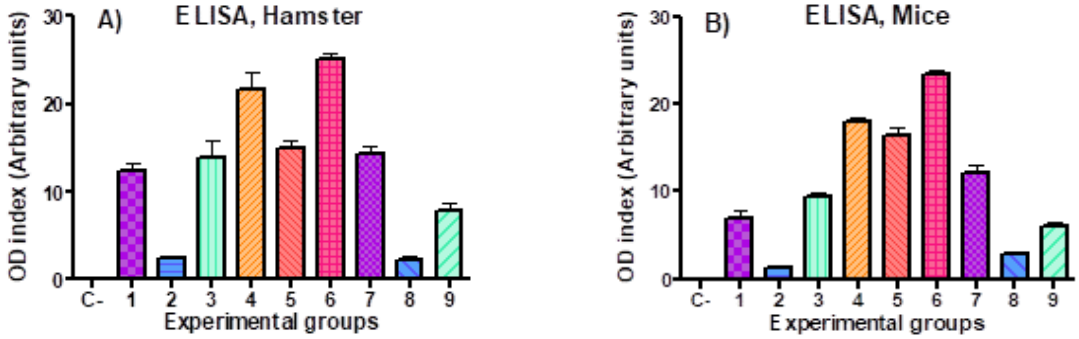
IC50, получено при третиране на клетки от изследваните ракови линии с етанол, е по-ниско в сравнение с етаноления извлек от всички дървесни гъби, т.е. сдържащите се в гъбите активни съставки понижават токсичното действие на етанола. Това потвърждава установеното протективно действие на активните съставки в дървесните гъби. Освен състоянието и преживяемостта на клетките под микроскоп беше наблюдавана и разтворимостта на природните вещества във вода и етанол. Това позволи събиране на сведения за оптимизиране на протокола за добиване на отделните извлеци. Както се вижда от микроскопските снимки разтворимостта на извлек от *Piptoporus betulinus* в етанол е по-ниска от тази в дестилирана вода.



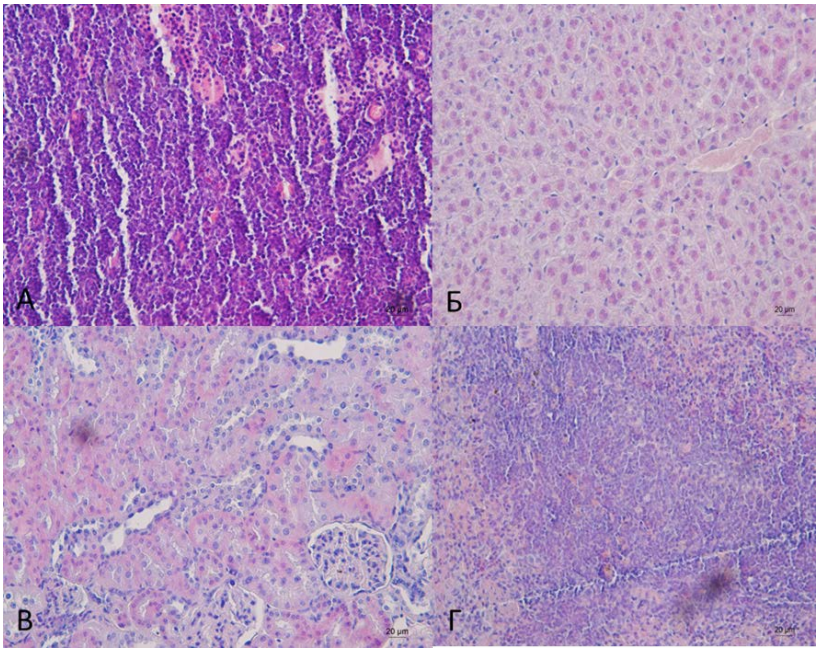
Задача 5.2. Оценка на пролиферативния и туморогенен потенциал на карциномни клетки; провеждане на хистопатологичен анализ на туморната тъкан и органите на

имунната система на третирани опитни животни. Изпълнители: ИМолБ-БАН, ИОХЦФ-БАН, ИЕМПАМ-БАН

Определена е имуномодулиращата активност по отношение на хуморалния имунитет на хемоцианини и техни производни изолирани от ***Helix aspersa***, ***Helix lucorum*** и ***Rapana venosa*** (1. HaH, 2. βc-HaH, 3. α-HaH, 4. HlH, 5. βc-HlH, 6. α-HlH, 7. RvHI, 8. RvHII, 9. Слуз над 20 kDa от H. aspersa). Титъра на специфичните антитела е определен при мишки и хамстери, чрез индиректен ELISA-анализ. Получените резултати са обработени математически и статистически. При хамстери и мишки се наблюдава почти еднакво стимулиране на хуморалния имунитет от съответните хемоцианини. Най-високи титри на специфични антитела бяха наблюдавани при експерименталните животни имунизирани с HlH и α-HlH съответно 21.7 ± 5.3 и 25.1 ± 1.4 при хамстери и 18 ± 0.7 и 23.5 ± 0.8 при мишки.

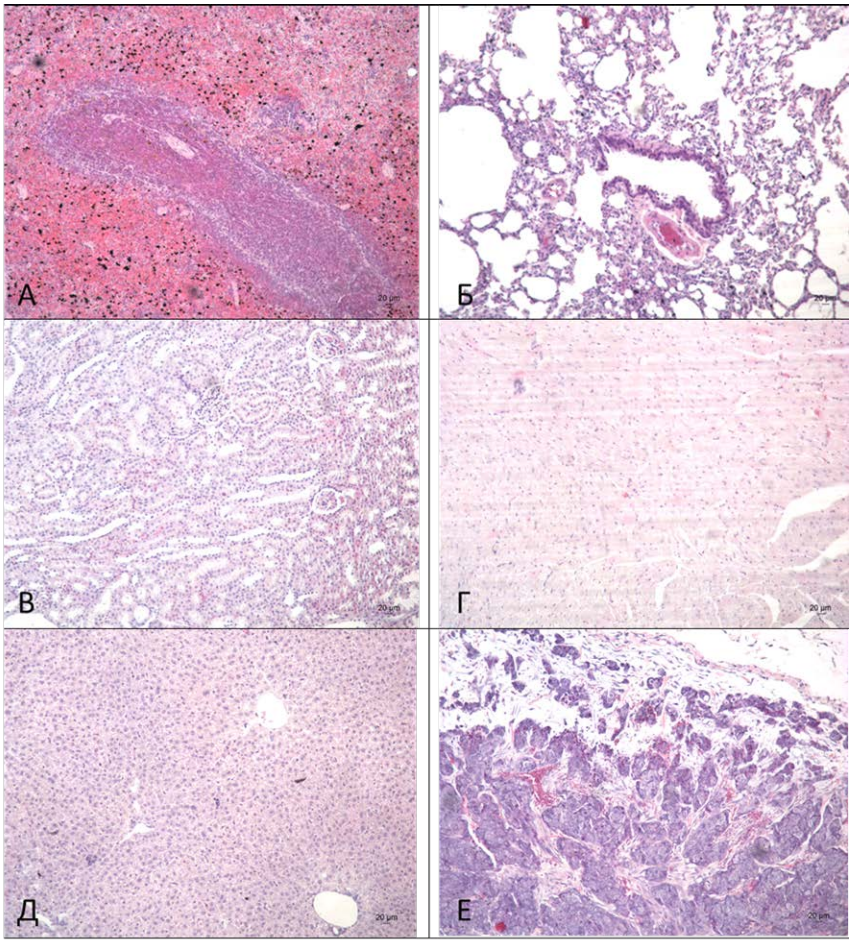


Извършена е морфологична оценка на органите свързани с имунната реакция, при експериментални животни (*Златен сирийски хамстер*) трикратно имунизирани през седем дни с изследваните хемоцианини. Групи 4 и 6: При лимфните възли се наблюдава паракортикален тип хиперплазия на лимфоидната тъкан; черен дроб – в норма; при бъбреците не се откриват отклонения от нормата; при слезката се наблюдава фоликулярна хиперплазия, бялата пулпа на слезката доминира, като съотношение спрямо червената.



Хистопатологичен анализ: хамстери от група 6 третирани с α-HlH:
А) лимфен възел, Б) черен дроб, В) бъбрек и Г) слезка

Извършена е морфологична оценка на жизнено важни органи, при експериментални животни (*Златен сирийски хамстер*), трикратно имунизирани през седем дни с изследваните хемоцианини. След това на животните са трансплантирани туморни клетки (*тумор на Графи*). Резултатите показват, че приложените имунологични препарати не предизвикват патоморфологични промени, свидетелстващи за токсично увреждане на изследваните органи. Не се наблюдава хепато-, нефро- и кардиотоксичност, както и промени в бял дроб, слезка и панкреас. По отношение на метастатичния потенциал на миелоидния тумор – не са открити метастази в паренхимните органи, с изключение на единични базофилни клетки, в тъкани от предсърдията на хамстер от група № 5, имунизиран с βc-HlH. Контролното вземане на материали от тумор, при имунизираните животни, показа по-голяма степан на диференциация на клетките, с добре обособена капсула и строма, за разлика от неимунизираните животни, при които се наблюдават ниско диференцирани клетки, анизокариоза и анизоцитоза, стромата е в минимални количества. Може да се направи извода, че изследваните хемоцианини в дадените концентрации и схеми на приложение не предизвикват патохистологични промени, свидетелстващи за токсично увреждане на паренхимните органи. Степента на реактивна хиперплазия в слезката и лимфните възли превишава тази, наблюдавана при контролите.



Хистопатологичен анализ: хамстери от група 8, третирани със субединица RvH II и с имплантиран тумор на Графи: А) слезка, Б) бял дроб, В) бъбрек, Г) сърце, Д) черен дроб, Е) миелоиден тумор на Графи

Резултатите от *in vitro* опити върху антипролиферативна активност, светлинно-микроскопски и ТЕМ изследвания на 9 проби хемоцианини и техни субединици от ***Helix aspersa***, ***Helix lucorum*** и ***Rapana venosa*** при аденокарцином на дебело черво (НТ-29) са обработени и анализирани и предстои публикуване.

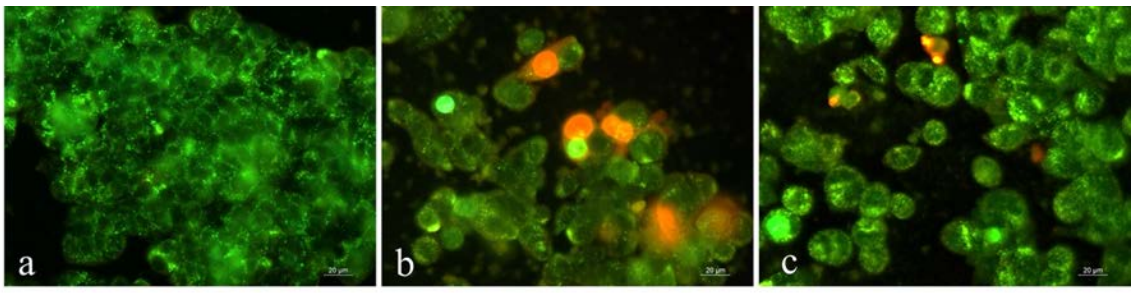
В *in vivo* опити е определен протективен антитуморен ефект на комплексни хитозан-алгинатни наночастици, съдържащи екстракт от ***Astragalus glycyphyllos L.*** при хамстери с експериментален *Graffi* тумор. Наночастиците, съдържащи растителен екстракт показва протективен антитуморен ефект оценен по показателите – понижена трансплантируемост на тумора, понижена смъртност, инхибиция на туморния растеж, повишена преживяемост.

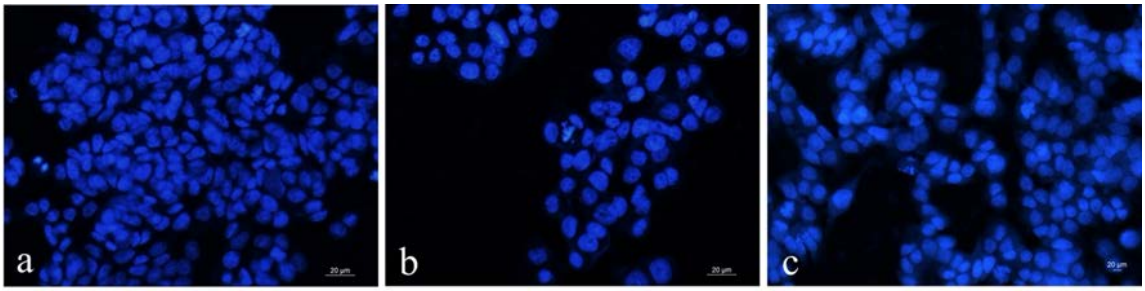
Изследвана е и антитуморната активност и цитоморфологичните изменения в два вида човешки туморни клетки – HeLa (аденокарцином на матка) и SH-4 (човешки кожен меланом) след въздействие с *кверцетин (QUE),* включен във влакнести полимерни

материали или приложен самостоятелно. Цитоморфологичните изменения на ниво клетка и ядро, наблюдавани след прилагане на флуоресцентни методи на изследване, показват ранно- и късно-апоптотични белези и при двата вида туморни клетки, третирани с изследваните наноструктурирани материали. Резултатите са в корелация с получените данни от МТТ теста.

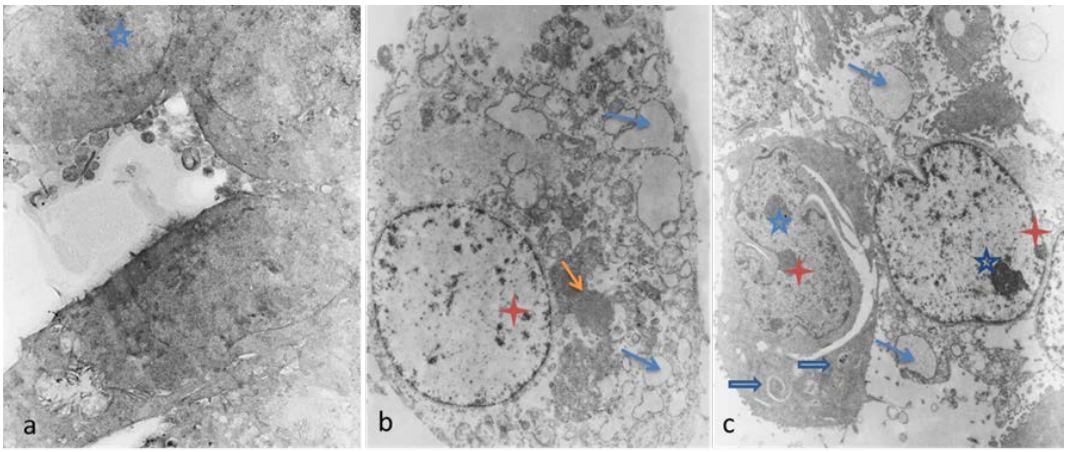
Задача 5.3. Изследване на механизма на индукция на клетъчна смърт в туморните клетки (апоптоза, некроза и/или автофагия). Изпълнители: ИМолБ-БАН, ИОХЦФ-БАН, ИЕМПАМ-БАН

Проведени са изследвания за оценка на *in vitro* антитуморната активност на хемоцианини, изолирани от морски охлюв ***Rapana venosa*** (RvH) и градински охлюви ***Helix lucorum*** (HlH) и ***Helix aspersa*** (HaH), както и слуз от охлюви *H. aspersa* в клетъчна линия от човешки колоректален карцином НТ-29. Ефектите на хемоцианините върху клетъчната жизнеспособност и пролиферация са анализирани чрез МТТ тест и промените в морфологията на туморните клетки са проучени чрез флуоресцентна и трансмисионна електронна микроскопия. Резултатите от МТТ теста показват, че мукусът и α-субединицата на хемоциани от *H. aspersa* имат най-значимата антипролиферативна активност от изследваните проби. Цитоморфологичният анализ показа, че наблюдаваните антитуморни ефекти са свързани с индукция на апоптоза в туморните клетки. Резултатите показват, че хемоцианинът и мукусът, изолирани от *H. aspersa* проявяват *in vitro* антинеопластна активност и потенциал за разработване на нови терапевтични средства за лечение на злокачествени неоплазии на дебелото черво.





Флуоресцентни микроскопии на HT-29 клетки, след третиране с БАВ, изолирани от H. aspersa; (a) контролна клетъчна култура; (b) третиране с α – HaH; (c) третиране с H. aspersa мукус



Трансмисионна електронна микроскопия на HT-29 клетки, след третиране с БАВ, изолирани от H. aspersa; (a) контролна клетъчна култура; (b) третиране с α – HaH; (c) третиране с H. aspersa мукус

Задача 5.4. Изследване с помощта на съвременни методи на механизмите на антитуморни ефекти на нови биоактивни средства/системи. Изпълнители: ИМолБ-БАН

Целта на изследването беше да се сравни *in vivo* до каква степен природните и синтетични PARP1 инхибитори физически блокират PARP1 върху местата с увреждане в ДНК и как това корелира с антитуморната им активност. Ето защо, беше измерена кинетиката на асоциация и дисоциация на PARP1 на местата на UV увредена ДНК *in vivo* посредством използване на микроскопия на живи клетки.

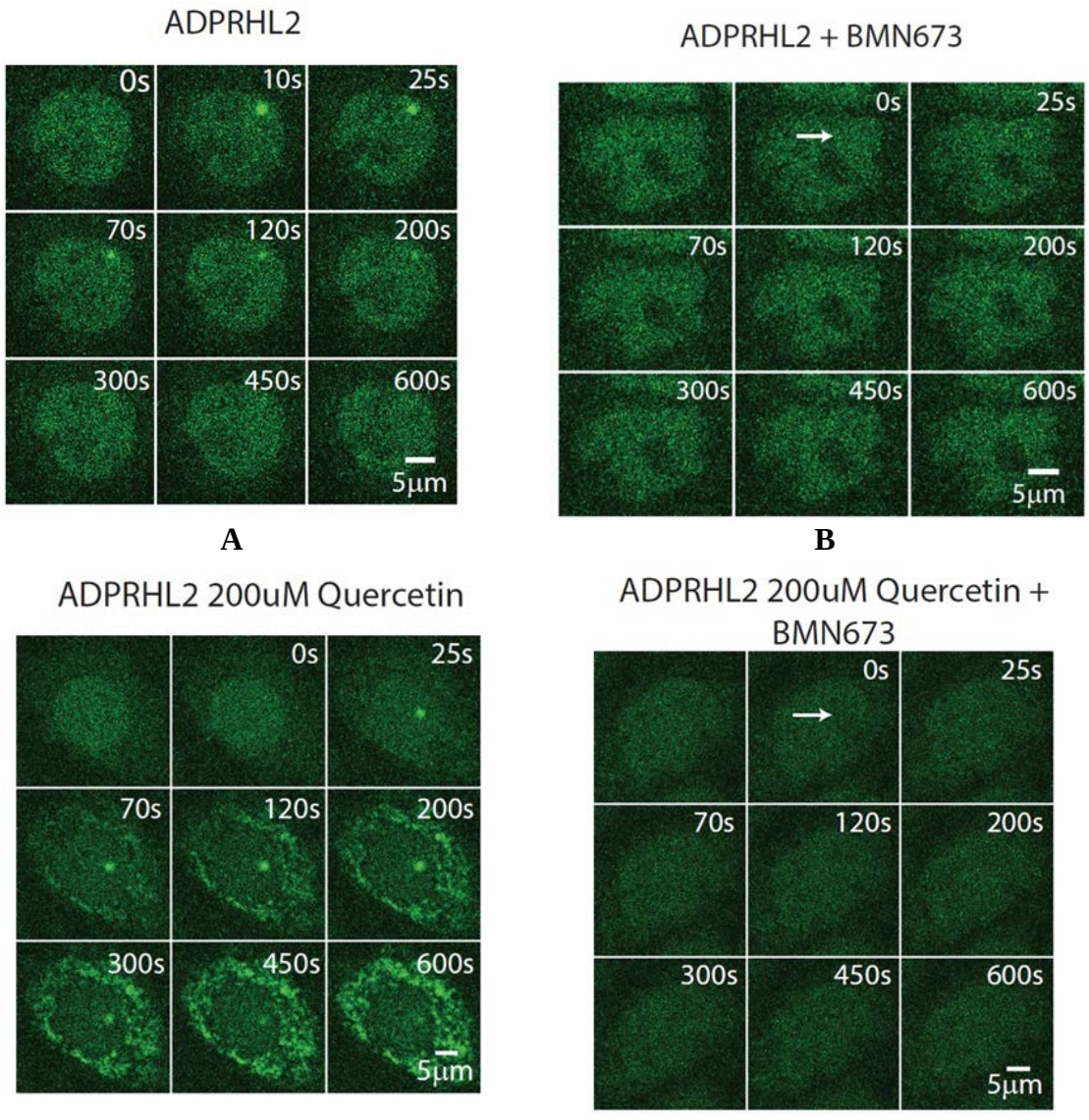
В предходния период ние установихме, че натрупването на PARP1 не се повлиява при третиране с талазопариб и кверцетин. За разлика от натрупването, дисоциацията на PARP1 се забавя драстично при третиране на клетките със синтетичния инхибитор талазопариб. Нетретираният PARP1 дисоциира с време за дисоциация на половината от количеството му равна на 92 секунди, докато третираният с талазопариб белтък дисоциира за 1008 секунди. Третирането на клетките с природното биологично активно

вещество кверцетин също забавя дисоциацията на PARP1, но само с 25 секунди. Третирането на клетките с кверцетин предизвиква трикратно увеличение на количеството на натрупания PARP1 за местата на ДНК увреждания в сравнение с нетретираните или третираните с талазопариб клетки. За да проследим как кверцетина предизвиква увеличение на количеството на натрупания PARP1 беше измерена кинетиката на натрупване на ADPRHL2. Този ензим е ADP-рибозилгликохидролаза която катализира отстраняването на ADP-рибоза от ADP-рибозилираните от Parp1 протеини. По тази причина ADPRHL2 се натрупва пропрозионално на активността на Parp1. Ето защо, натрупването на ADPRHL2 е количествен индикатор за каталитичната активност на PARP1. Ние използвахме BAC конструкт (бактериални изкуствени хромозоми), съдържащ гена на ADPRHL2, слят с гена на белтъка EGFP, който флуоресцира в зелено при облъчване със светлина с дължина на вълната от 488 nm. Предимството на използването на BAC конструкти е, че те съдържат не само кодиращите последователности на изследвания ген, но и неговите регулаторни участъци като промотор, енхансери, интрони и терминиращи елементи . Това позволява слетия белтък да се експресира в количество близко до ендогенния, да се експресират различните му сплайсинг варианти и да се експресира под контрола на клетъчния цикъл.

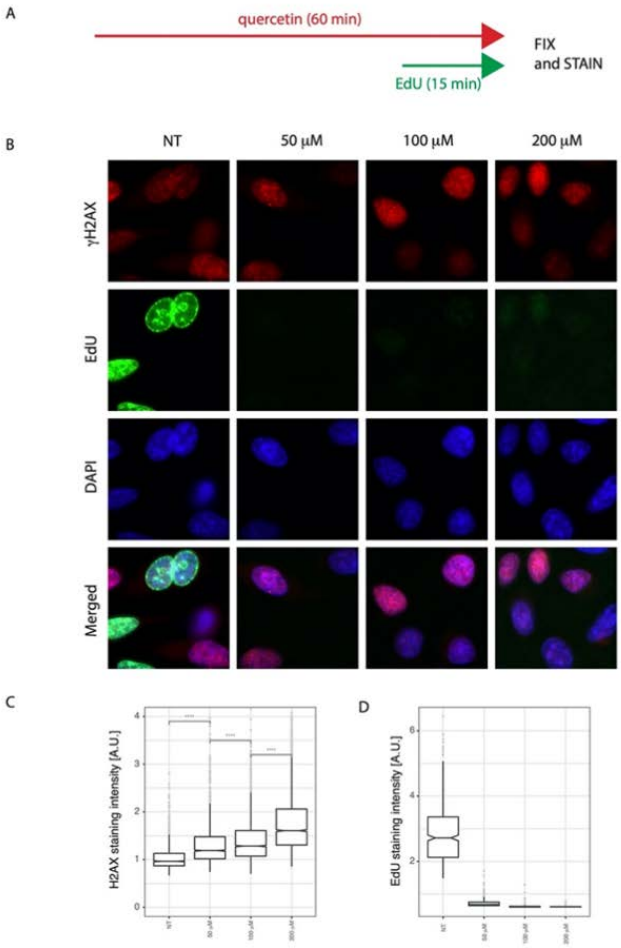
Тази конфигурация на експеримента заедно със стабилната клетъчна линия, експресираща EGFP- ADPRHL2 ни позволи да наблюдаваме поведението на ADPRHL2 в милисекунден диапазон след създаването на UV повреди. Стабилна клетъчна линия, която съдържа EGFP-белязан PARP1 белтък се посява 24 часа преди микроскопиране с 40% конфлуентност в петри с покривно стъкло на дъното. Преди микроскопиране средата се заменя със свободна от Phenol Red среда и клетките се прехвърлят в инкубатор, монтиран на микроскопа, поддържащ 37°C и 5% CO_2. За анализ на получените изображения е rpmf.pldkd компютърна програма CellTool. Чрез нея е компенсирано движението на клетките по време на заснемането. Средният интензитет и площта на три различни интересуващи ни региона (ROIs) бяха измерени във времето за всяка клетка. Първият ROI включва региона на увреждане на ДНК и се използва за отчитане на количеството на белязаните белтъци, които се натрупват на местата на повредите. Вторият ROI включва област от същата клетка, която не е засегната от UV лазера. Накрая се измерва област извън клетките за отчитане на фоновия шум на камерата. Измерените интензитети от трите района бяха използвани за пресмятане на общите интензитети от флуоресценцията на EGFP на местата на ДНК увреждания, които

са пропорционални на количеството на натрупания EGFP- ADPRHL2. Така е заснета кинетиката на натрупване на ADPRHL2 без третиране с инхибитор, при третиране със синтетичния PARP1 инхибитор талазопариб, както и при третиране с природното биологично активно вещество кверцетин. ADPRHL2 се натупва с кинетика подобна на кинетиката на натрупване на PARP1 което потвърди че ADPRHL2 хидролизира ADP-рибозата от ADP-рибозилираните протеини на местата на ДНК увреждания. При инхибиране на PARP1 чрез талазопариб ADPRHL2 не се натупва на местата на ДНК увреждания което показва че ADPRHL2 хидролизира ADP-рибозата от рибозилираните от PARP1 белтъци. Третирането с природното биологично активно вещество кверцетин не инхибира натрупването на което показва че кверцетин не инхибира синтезата на поли ADP-рибозата от PARP1. В замяна на това, изненадващо, третирането с кверцетин води до делокализация на ADPRHL2 от ядрото в митохондриите. Този ефект се наблюдава при специфичен вид програмирана клетъчна смърт наречена партанатос. При партанатос, генерирането на голямо количество поли ADP-рибоза води до частичната и хидролиза и дислоцирането и в митохондриите. Наличието на поли ADP-рибозата най-вероятно води до релокализацията на ADPRHL2 в митохондриите. Третирането едновременно с кверцитин и талазопариб предотвратява локализацията на ADPRHL2 в митохондриите, за да покаже че PARP1 е необходима предпоставка за релокализацията на ADPRHL2.

Изследван беше ефекта на кверцетин върху ДНК репликацията, като PC3 клетки бяха третирани с инхибитора и белязани с нуклеозидния аналог EdU. Резултатите показаха, дозо-зависимо натрупване на gH2AX в третираните клетки което показва че третирането с кверцетин води до натрупване на ДНК увреждания. Същевременно, скоростта на репликацията в третираните клетки беше драстично потисната. Получените резултати показват, активирането на S-фазния контролен пункт в резултат на третирането с кверцетин. Така нашите изследвания хвърлиха светлина върху механизмите на въздействие на природното биологично активно вещество кверцетин върху клетъчните процеси.



*Кинетиката на натрупване на ADPRHL2. (**A**) без третиране с инхибитор; (**B**) при третиране със синтетичния PARP1 инхибитор талазопариб (БМН673); (**C**) при третиране с природното биологично активно вещество кверцетин; (**D**) при третиране с кверцетин и талазопариб (БМН673)*



Ефект на третирането с кверцетин върху репликацията и репликационния стрес в PC3 клетки

Работен пакет 6 **Моделиране, прогнозиране и модулиране на терапевтичния ефект на БАВ чрез комплекс от теоретични, изчислителни и експериментални методи и техники**

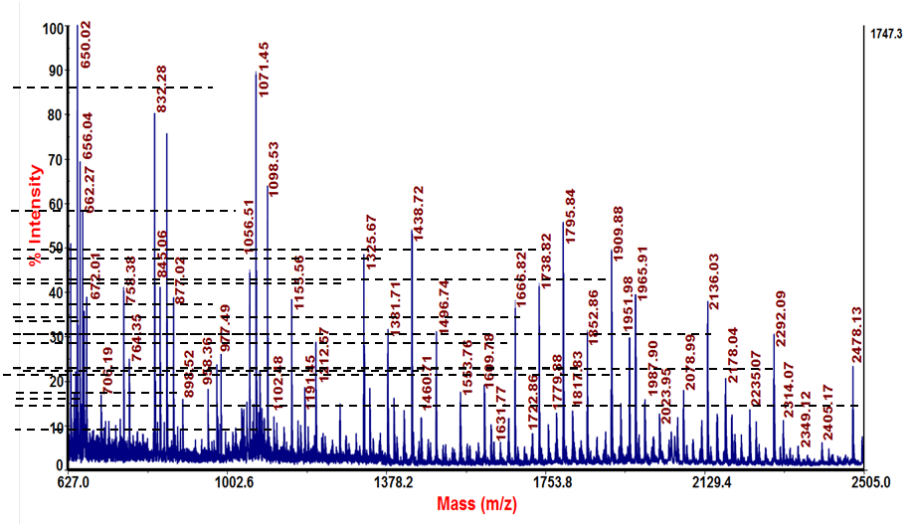
Ръководител на работния пакет**: доц. д-р Невена Илиева**

Задача 6.1. Определяне на първичната и пространствената структура на индивидуални пептиди и гликопептиди в многокомпонентни смеси с природен произход. Изпълнители: ИОХЦФ-БАН, ИИКТ-БАН

Изследванията бяха насочени към идентифициране на индивидуални пептиди и гликопептиди в многокомпонентни смеси с природен произход, определяне на

първичната и олигозахаридни структури и тяхното охарактеризиране чрез комплекс от масспектрометрични техники и методи, както и прогнозиране на вероятни структурни елементи на пептиди с неизвестна 3D структура чрез набор от моделни техники. Необходимо беше да се направи и класификация на изследваните пептиди и да се валидират получените резултати чрез ЯМР структурни изследвания на представителни пептиди.

Изследвани бяха две групи пептиди, изолирани от нискомолекулните фракции (молекулна маса < 3 kDa) на слузта на градинския охлюв ***Helix aspersa*** – 10 пептида в група А и 15 пептида в група В. Бяха определени йонните интензитети на пептидите от втората група на базата на техния MALDI-MS спектър. Масите (измерени и изчислени) и йонни интензитети на новоизолираните пептиди от група В от слузта на *Helix aspersa* са представени в Таблицата.



MALDI-MS спектър на пептидите от група В от слузта на градински охлюв Helix aspersa

	Sequence	% Intensity	[M+H]⁺ (Da)	pI	Mass calculated
1	MLGGGWNPPK	45%	1056.51	8.50	1055.52
	LPDSWEPGGGG	90%	1071.45	3.67	1070.47
2	MLGGVLGGGPLK	64%	1098.53	8.50	1097.63
3	MGVGAVWNGHK	48%	1155.56	8.52	1154.59
4	MLGGGVNSLRPPK	49%	1325.67	11.00	1324.73
5	MLNVAVNKGEVKH	54%	1438.72	8.37	1437.78
6	NLVGGLSGGGRGGAPGGGG	30.5%	1496.74	9.75	1495.75
7	MGGLLGGGGVGGGSLVGPGAP	38%	1666.82	5.28	1665.85
8	LFGGHQGGGLVGGLWRK	42%	1738.82	11.00	1737.94
9	LLLDGFGGGLLVEHDPGS	56%	1795.84	4.02	1794.92
10	MGGWGGLGGGHNGGWMPPK	31%	1852.85	8.52	1851.83
11	MPKGGGLVGGLLGDWMGHK	50%	1909.88	8.37	1908.97
12	MVNLALVGGLLGGKCLAPAR	30%	1951.98	9.50	1952.01
13	ENLGGGLVGGLLGGWFLHDPK	48%	2136.03	5.32	2135.12
14	MPKRALGGGLVGGLLGGGGEGLLVN	31%	2292.09	8.50	2291.24
15	HAFDVAVGGLLGGGGAGGGGLVGGGGLGGGGA	23.5%	2478.13	5.08	2477.24

Задача 6.2. *In silico* изследване на поведението в разтвор на новоизолираните пептиди в моно- и мултипептидни състави. Експериментални представители на класовете пептиди, определени в задача 6.1. Изпълнители: ИОХЦФ-БАН, ИИКТ-БАН

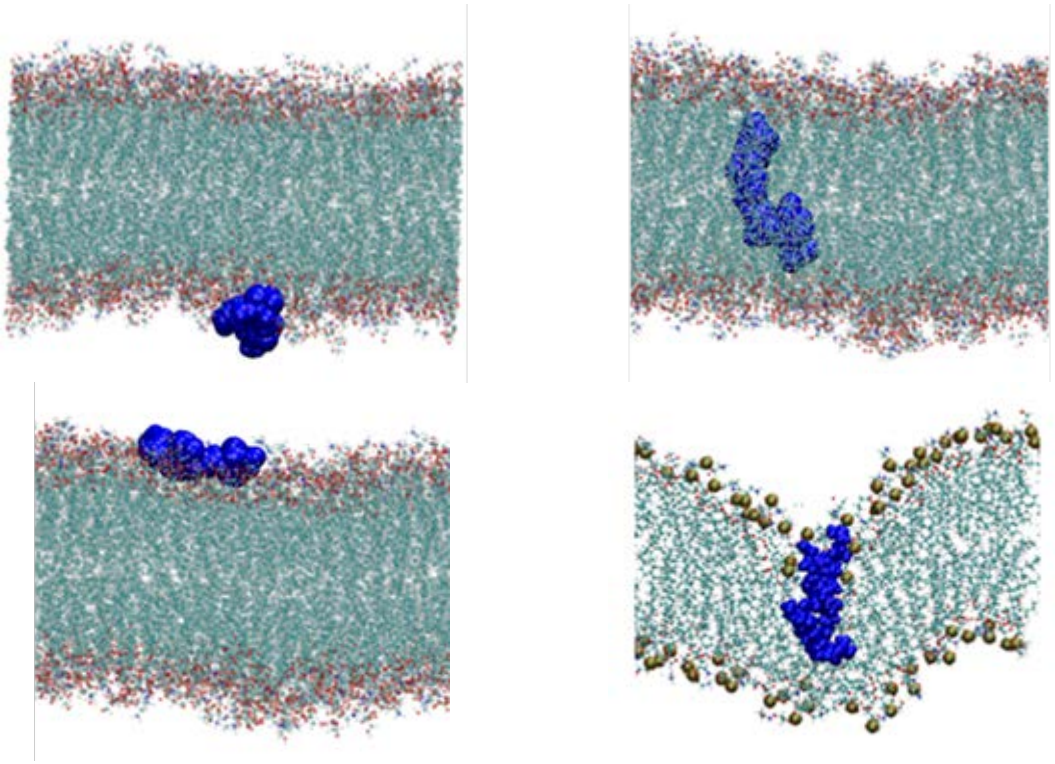
С комбинация от *in silico* техники бяха разработени 3D модели на всички новоизолирани пептиди. Тези модели бяха използвани за входни структури за молекулно-динамични и метадинамични симулации, които имат за цел да отговорят на няколко важни и неизяснени досега въпроса за динамиката и механизма на антимикробно действие на антимикробните пептиди като цяло и на конкретните новоизолирани пептиди в частност. Беше потвърдена хипотезата ни за съществуването на колективни процеси – самоорганизация на индивидуалните пептиди в клъстери – през периода, предшестващ атакуването на набелязаната бактериална клетка (мембрана). Формирането на тези клъстери е обусловено от амфифилната природа на АМП и зарядово-обусловените взаимодействия между тях и със средата. Първоначално трябваше да бъде разбрано поведението в разтвор на всеки един от новоизолираните пептиди. Бяха проведени молекулно-динамични симулации на няколко представителни пептида, като предстои изчерпателно изследване на цялостната извадка.

Започнати са моделни изследвания на многокомпонентна смес от представителни новоидентифицирани АМП от група В в съответстващи на експериментално измерените интензивности концентрации, които са в начална фаза. Продължава изучаването на природата и типовете формирани клъстери от пептиди в моно- и поликомпонентни смеси.

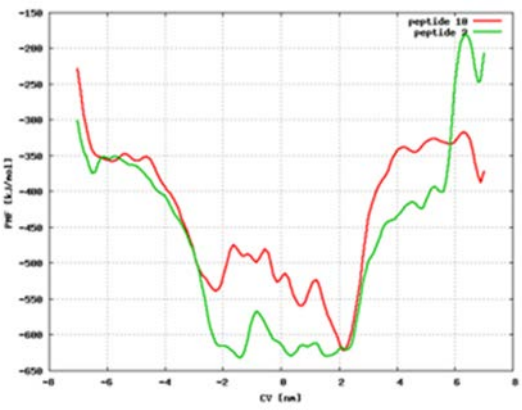
Задача 6.4. Моделиране и анализ на пептид-мембранно взаимодействие: енергетика, фазова структура, образуване на пори, пептидна дифузия. Изпълнител: ИИКТ-БАН

За изясняване на антимикробния потенциал на новоизолираните пептиди с цел последваща селекция на кандидати за биотерапевтици, е необходимо ясно разбиране на процеса на взаимодействието им с бактериалната мембрана. За целта беше разработена моделна структура на асиметрична мембрана и конструирана тестова система, имитираща реалните условия на клетъчната среда в организма. За ускоряване на семплирането на конформационното пространство беше използвана темперирана

метадинамика. Тези изследвания са в начална фаза, но първите резултати показват разнообразие в изследвания процес. Така, при един от пептидите се наблюдава формиране на пора и преминаване от другата страна на мембраната (проникване в клетката), докато при друг от пептидите – p10, се наблюдава огъване на мембраната, но не се стига до перфорацията й. Изясняването на причините за подобни различия е непосредствено свързано с идентифицирането на потенциални активни компоненти в мултикомпонентната природна смес и е обект на продължаващи изследвания.



Метадинамична симулация, демонстрираща преминаване на пептид от група А (p2) през моделната мембрана в условна положителна посока. Метадинамична симулация, демонстрираща деформиране на бактериалната мембрана за пептид p10.



Представен е и профилът на потенциалната повърхнина за двата пептида в зависимост от стойностите на колективната променлива, като за такава е избрано разстоянието между центровете на масите на пептида и мембраната. С тези пилотни изследвания е подготвена рамката за последващи скринингови молекулно-динамични и метадинамични изследвания на пептидите от фракция 1.

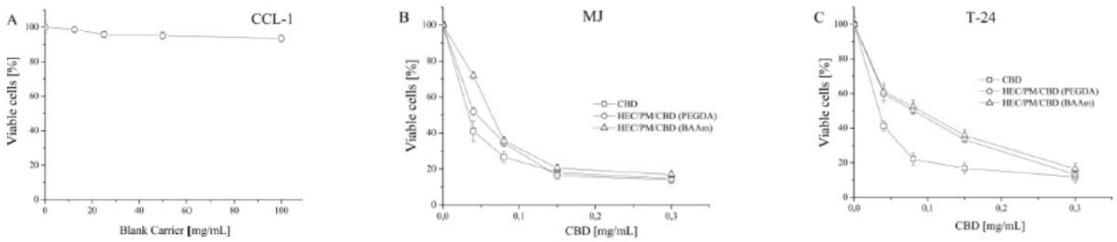
Работен пакет 7 **Изследване на новите нискотоксични биологично активни средства/системи, от гледна точка на приложимостта им в биофармацевтичната промишленост**

Ръководител на работния пакет**: проф. д-р Спиро Константинов, дм**

Задача 7.1. Изследване на безопасността от гледна точка на генотоксичност, канцерогенност, мутагенност и тератогенност. Изпълнители: МУ-ФФ-София, ИОХЦФ-БАН

Получените в РП 1, РП 4 и РП 5 резултати, показват, че екстрактите от ***Astragalus***, от ***Helix aspersa*** и ***Rapana venosa***, и особено тези съдържащи канабидиол имат сериозен потенциал по отношение на тяхната антинеопластична активност при модели от кожен Т-клетъчен лимфом и рак на пикочния мехур.

На получените в РП 1.3. нанокомпозитни криогелове беше изследвана цитотоксичността, като първоначално беше проследен инхибиращият ефект на ненатоварени криогелови системи върху пролиферацията на миши фибробластни клетки (CCL-1). Резултатите показват, че ненатоварените криогели са лишени от всякаква цитотоксичност, тъй като не се наблюдава потискане на жизнеността на третираните клетки (стойности в диапазона 94-98%).



Като следваща стъпка беше проведено сравнително проучване относно антиплролиферативната активност на свободния канабидиол и неговите нанокомпозитни криогелови форми. Във всички експерименти използвахме стандартен тест за биологичен анализ на цитотоксичност, основан на ензимното редуциране на жълтата тетразолиева сол MTT до виолетов MTT-формазан от митохондриалната сукцинат дехидрогеназа в жизнеспособни клетки. *In vitro* антинеопластичната активност беше оценена спрямо две човешки туморни клетъчни линии MJ (Т-клетъчен лимфоцит) и Т-24 (карцином на пикочния мехур). От кривите концентрация-ефект бяха получени

еквиефективни инхибиращи концентрации (IC50). Очевидно както свободният CBD (приложен като етанолов разтвор), така и формулираният CBD проявяват цитотоксичност, зависима от концентрацията. При по-ниски концентрации на природното вещество, ефектът на свободния CBD е по-изразен. Стойностите на IC50 за двете нанокомпозитни HEC/PM криогелни системи (омрежени с PEAGA и BAAm) бяха по-високи от получените за свободното лекарство (с идентична величина на модулация) в зависимост от типа на клетките.

cell line / sample	**MJ**	**T-24**
	IC_{50}	
CBD	0.033	0.034
HEC/PEGDA/PM/CBD	0.046	0.071
HEC/BAA/PM/CBD	0.058	0.090

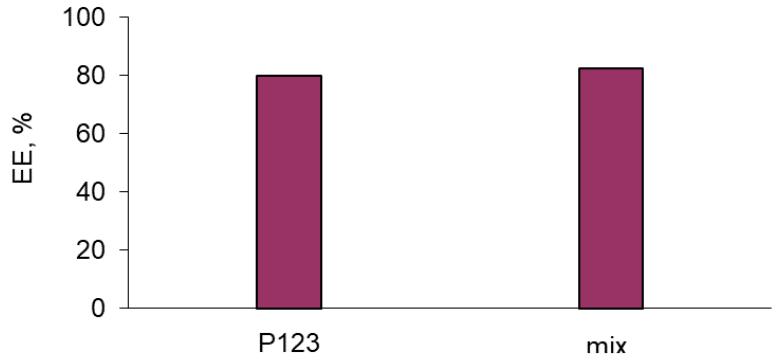
Представените данни показват, че е възможно получаването на водноразтворима форма на канабидиол с едноетапна реакция на активното вещество с HEC криогел. С прецизиране на масовото съотношение CBD/HEC до 1:10 могат да се произведат супер-макропорьозни криогелове с добив на гелна фракция от 80-85% при висок ъптейк на вода и добри механични свойства. Благодарение на приложената методика се получава полимерна матрица с регулярно включване на канабиодиол, при което активното вещество е в аморфно състояние. Фармакологичните тестове показват, че нанокомпозитните криогелни носители запазват антинеопластичната активност на канабиодиола и дават възможност за удължено локално лекарствено освобождаване. Такива базирани на криогелове лекарство-доставящи системи могат да бъдат от полза при пациенти с кожни лезии в резултат на кожен Т-клетъчен лимфом, както и при пациенти с рецидивиращ неинвазивен рак на пикочния мехур като оклузивна кожна превръзка и форма за интравезикална инстилация.

Задача 7.2. Определяне на първичната и пространствената структура на индивидуални пептиди и гликопептиди в многокомпонентни смеси с природен произход

Получените в РП1, РП4 и РП5 резултати, показват, че екстрактите от ***Astragalus***, от ***Helix aspersa*** и ***Rapana venosa***, и особено тези съдържащи **канабидиол** имат сериозен потенциал по отношение на тяхната антинеопластична активност при модели от кожен Т-клетъчен лимфом и рак на пикочния мехур.

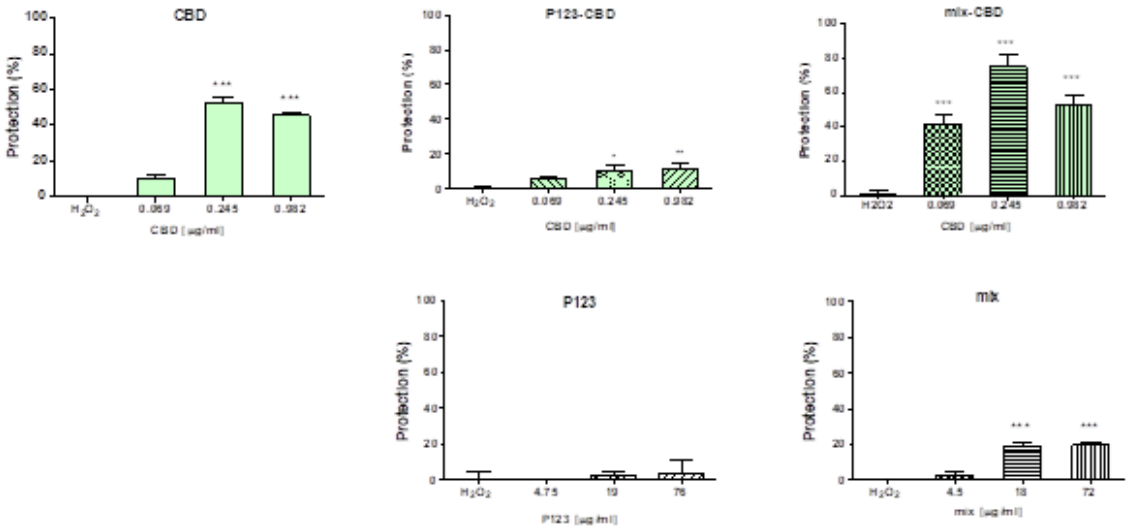
Задача 7.3. Оптимизиране на форми за локално и перорално приложение

Ниската водоразтворимост на канабидиола е проблемно свойство, което би рефлектирало върху стабилността на изготвяните лекарствени форми и ефективността от клиничната му употреба. Включването на канабидиол в мицелна лекарство-доставяща система е сред подходите, които могат да решат тези проблеми. В тази връзка, една от целите беше да се разработи технологичен режим за включване на канабидиол в наноразмерни мицели. Като носители за разработването на мицелите бяха използвани триблокови съполимери на поли(етиленов оксид) и поли(пропиленов оксид) (Плуроник P123 и Плуроник F127). Формирането и натоварването на мицелите с канабидиол беше осъществено по филм хидратиращия метод. При този метод, към метанолен разтвор на съответния съполимер (Плуроник P123 или комбинация от Плуроник P123 и F127) беше прибавен канабидиол, след което органичната фаза беше изпарена до образуването на филм. Полученият филм беше редиспергиран и мицелният разтвор беше филтруван (0.22 μm). Установено е, че и с двата типа съполимерни носители се постига подобна ефективност на включване на канабидиол от приблизително 80%.



Ефективност на включване (EE) на канабидиол в съполимерни мицели

Проведено е изследване на ефектите на канабидиол – свободен и натоварен, в два вида полимерни мицели, в модел на индуцирано от H_2O_2 увреждане (1 mM, 10 min) в невробластомна клетъчна линия NEURO-2A. Извършено е предтретиране на клетъчната линия NEURO-2A с разтвори на канабидиол (CBD),канабидиол, натоварен в полимерни мицели (P123-CBD) и канабидиол в комбинацията P123/F127 (mix-CBD). Проследени са и ефектите на двата вида ненатоварени мицели в съответните концентрации. След един час е индуцирано увреждане с 1 mM H_2O_2 за 10 min. Жизнеността на клетките е оценена след 24 h.



Ефекти на свободен канабидиол и канабидиол, натоварен в двата типа мицели (P123 и mix) в модел на индуцирано от H_2O_2 увреждане в невробластомна клетъчна линия NEURO-2A

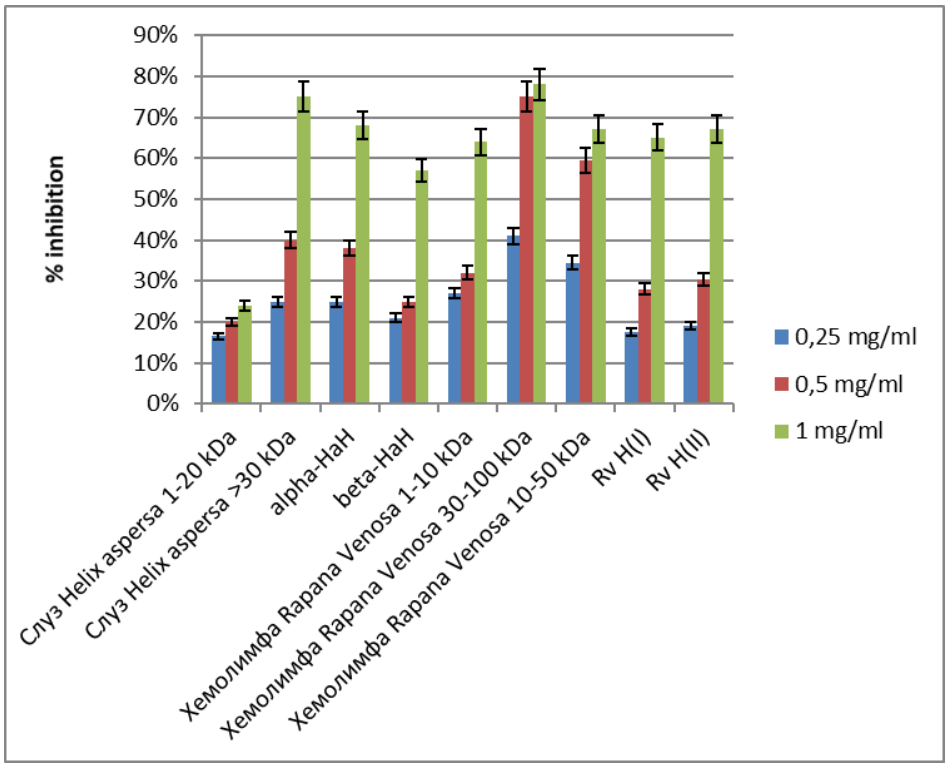
От получените резултати е видно, че при инкубиране на клетките със CBD са налице статистически значими протективни ефекти в концентрации 0.245 и 0.982 µg/ml, изразяващи се в запазване на клетъчната жизненост с 53 % и 45 % *vs* H_2O_2 (***p< 0.001). Предтретирането с натоварен P123-CBD, показва значително по-слаба протекция от свободния CBD, а ненатоварения полимерен носител P123 не проявява протективни ефекти. За разлика от това, предтретирането на клетките с mix-CBD показа добре изразени цитопротективни ефекти и в трите изследвани концентрации. Важно е да се отбележи, че протекцията при mix-CBD е по-силно изразена, спрямо свободния CBD. Наблюдава се запазване на клетъчната жизненост дори при най-ниската използвана концентрация, в която свободният CBD не проявява протективни ефекти. Интерес представлява фактът, че при предтретирането на клетъчна линия NEURO-2A със свободния носител mix, също бяха наблюдавани протективни ефекти.

Работен пакет 8 **Разработване на иновативни хранителни добавки и козметични средства за локално приложение с превантивен потенциал за персонализирана медицина**

Ръководител на работния пакет**: проф. д-р Стоян Шишков**

Задача 8.1. Подбор на показалите най-голяма ефективност биологично активни средства/системи. Изпълнители: ИОХЦФ-БАН, НСА

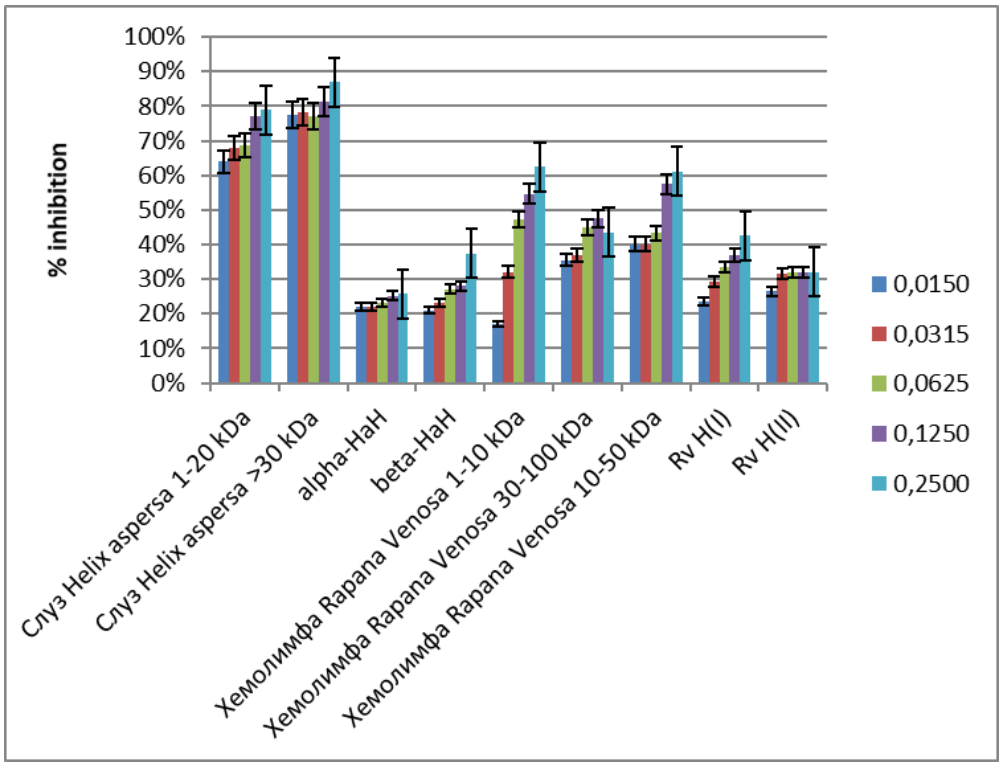
В химически системи, генериращи активни форми на кислорода (АФК) – супероксидни радикали и хидроксилни радикали, беше определена антиоксидантната активност на общо 9 препарата (4 препарата от ***Helix aspersa*** и 5 препарата от ***Rapana venosa***), а именно: Слуз 1-20 kDa; Слуз >30 kDa; α-субединица на хемоцианин (α-HaH); β-субединица на хемоцианин (β-HaH); Хемолимфа 1-10 kDa; Хемолимфа 30-100 kDa; Хемолимфа 10-50 kDa; Структурна субединица 1 (Rv H I); Структурна субединица 2 (Rv H II). Резултатите показват дозо-зависим ефект при всички тествани препарати. Най-добър инхибиторен ефект има хемолимфата от *R. venosa* 30-100 kDa, следвана от препарата от хемолимфата от *R. venosa* 10-50 kDa. Като добър уловител на $O_2^{-\bullet}$ се проявява и слузта от *H. aspersa* >30 kDa, която в най-високата тествана концентрация има същия ефект като препарата от *R. venosa* 30-100 kDa. Алфа-субединицата на *H. aspersa* има по-добра инхибираща способност от бета-субединицата. Най-слаб ефект проявяваше слузта от *H. aspersa* 1-20 kDa.



Активност на препарати от Helix aspersa и от Rapana venosa като уловители на супероксидни анион радикали (NBT тест)

Изследвана е и активността на препаратите от *H. aspersa* и от *R. venosa* като уловители на хидроксилни радикали (•OH). Резултатите показват, че препаратът от слуз

от *H. aspersa* >30 kDa има най-висок •OH-скевинджер ефект, последван от препарата от слуз от *H. aspersa* 1-20 kDa, в сравнение с останалите тествани препарати. Препаратите, съдържащи α-субединица и β-субединица от хемоцианин на *H. aspersa* показват нисък инхибиращ ефект в сравнение със слузта. От препаратите от *R. venosa* най-добър •OH-скевинджер ефект показват фракциите 1-10 kDa и 10-50 kDa. Препаратите от структурните единици 1 и 2 (Rv H(I) и Rv H(II) имат сравнително по-слаб ефект. Структурната единица Rv H(I) в по-високите тествани концентрации има по-добър инхибиторен ефект в сравнение с Rv H(II).



Активност на препарати от Helix aspersa и от Rapana venosa като уловители на хидроксилни радикали (Дезоксирибозен тест)

В обобщение, слузта от *H. aspersa* >30 kDa проявява много добра антиоксидантна активност, потискайки във висока степен действието на супероксидните и хидроксилни радикали. Добър антиоксидантен потенциал имат и фракциите от хемолимфа на *R. venosa*, като те показват специфичност: хемолимфата от *R. venosa* 30-100 kDa е най-добър ловител на супероксидни радикали, а хемолимфните препарати 1-10 kDa и 10-50 kDa имат по-добър •OH-скевинджер ефект в сравнение с хемолимфата от *R. venosa* 30-100 kDa. Фракциите на структурните субединици от *H. aspersa* и от *R. venosa* имат сравнително нисък антиоксидантен потенциал спрямо действието на супероксидните и хидроксилни радикали.

Проучване на ефекта на слуз от Helix aspersa като хепатопротектор в модел на чернодробно увреждане, индуцирано от Acetaminophen

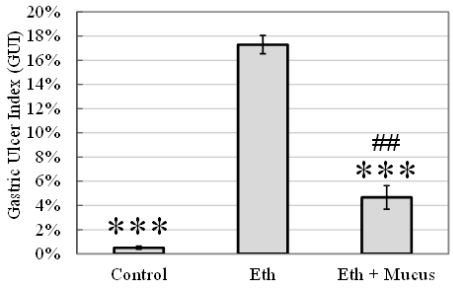
Проучен беше ефекта на слуз от *Helix aspersa* в модел на чернодробно увреждане, индуцирано от ацетаминофен (*Acetaminophen,* APAP) чрез определяне на активностите на аспартат трансаминаза (AST) и аланин трансаминаза (ALT) в серум, както и чернодробен глутатион (GSH) и нива на малондиалдехид (MDA) от контролни и третирани животни. Работната хипотеза за положителен ефект на слузта от охлюв се основаваше на предварително получените данни за добра антиоксидантна активност на слузта в химически системи, генериращи АФК и оксидативната етиология на чернодробното увреждане, индуцирано от *Acetaminophen*. Мъжки бели мишки бяха третирани в продължение на 1 седмица със слуз от *Helix aspersa* (0.5 ml). Дванадесет часа преди умъртвяване бяха инжектирани с ацетаминофен (APAP) (i.p. 350 mg/kg body weigh). Прилагането на APAP на мишките предизвика значително ($p < 0,001$) увреждане на черния дроб и некроза на клетките, което се доказва от повишените серумни нива на чернодробни ензими ALT и AST в сравнение с контролната група. За съжаление, ефектът от предварително третиране със слуз от *Helix aspersa* не показа значително понижение на серумните активности на тези ензими, както и не повлия значително на показателите за оксидативен стрес – индуцираната липидна пероксидация и намалените нива на глутатион от въздействието на APAP. Следователно, слузата от *H. aspersa* в този модел на хепатотоксичност не показа значителен протективен ефект.

Проучване на протективния ефекта на слуз от Helix aspersa върху етанол-индуцирани стомашни язви при мишки

Мъжки бели мишки бяха разделени на три групи: **(i)** контролна (*Control*), **(ii)** третирани с етанол (*Eth*) и **(iii)** претретирани със слуз от охлюви и третирани с етанол (*Mucus + Eth*). Мишките от група *Mucus + Eth* бяха претирани със слуз от охлюви (10 ml/kg). Един час по-късно бяха индуцирани стомашни язви чрез прилагане на 96% етанол (10 ml/ kg, per os) в групите *Eth* и *Mucus + Eth*. След един час мишките и от трите групи бяха евтаназирани и стомасите им бяха изрязани. С помощта на цифров фотоапарат бяха направени снимки на стомашната лигавица и язвите бяха количествено определени чрез изчисляване на *индекс на стомашни язви* (*GUI*) и *процент на защита* (*PP*) от приложения препарат от охлюви. В стомашния хомогенат бяха определяни нива на липидна пероксидация и концентрация на GSH, а в постмитохондриална супернатанта –

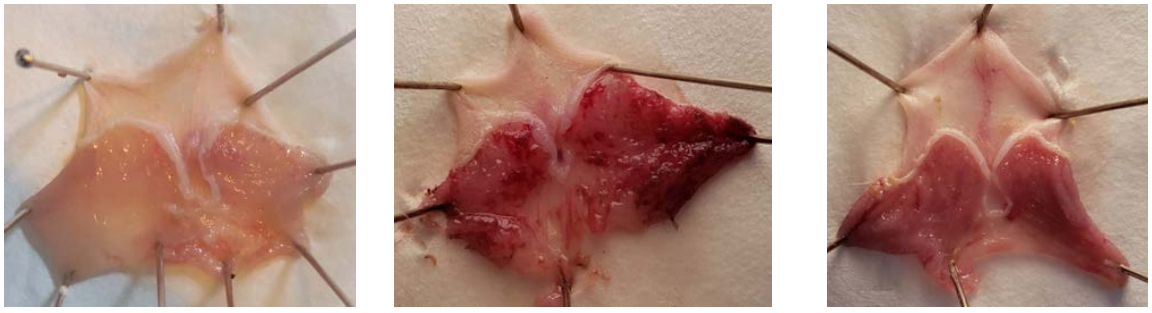
активността на антиоксидтните ензимни супероксид дисмутаза, каталаза и глутатион-редуктаза.

Индекс на стомашни язви (GUI)



Животните, третирани само с етанол имаха лезии с голяма хеморагична некроза на стомашната лигавица. При животните с предварително приложение на охлювена слуз бяха наблюдавани само малък брой хеморагични полета. Намалението на хеморагичните лигавични увреждания в групата, обработена със слуз, беше статистически достоверно в сравнение с етаноловата група. Втората фигура показва, че GUI е значително понижен при мишки, предварително третирани със слуз от охлюв, в сравнение с етаноловата група (4.7% срещу 17.3% съответно). Процентът на защита (PP) се изчислява на 73%.

Control Eth Mucus + Eth



Макроскопска морфология на стомаси на мишки от контолна група (Control), група мишки, третирани с етанол (Eth) и група мишки, претретирани със слуз от охлюв и третирани с етанол (Mucus +Eth)

Изследван беше и ефектът на слузта от охлюви върху нивото на липидната пероксидация (ЛПО), концентрацията на GSH и активността на антиоксидантните ензими (SOD, CAT и GR) в увредена с етанол стомашна тъкан. Измерената в стомаха ЛПО макар и недостоверно беше по-висока в групата на мишките, третирани с етанол спрямо контролната група. Претретирането със слуз, обаче, доведе до повишаване на концентрация на MDA (индекс за ЛПО), което вероятно се дължи на наличието на мулополизахариди в слузта, които дават положителна реакция с използвания методически реактив. Наблюдавано беше значително изчерпване на концентрацията на GSH в етаноловата група, като прилагането на охлювена слуз води до възстановяване на този показател. Активността на антиоксидантните ензими SOD, CAT и GR в черен дроб на мишки, третирани с етанол значително намаляваха в сравнение с тези от контролната

група. Предварителното третиране на мишките със слуз от охлюв статистически достоверно възстановява активността на SOD и GR по отношение на групата на мишките, третирани с етанол. Активността на CAT беше незначително по-голяма, отколкото в групата с етанол. Тези данни сочат добър протективен ефект на слузта от охлюви при стомашни язви.

Работен пакет 9 **Разпространение на резултатите**

Задача 9.1. Създаване на интернет страница с представяне на Програмата

Създадената интернет страница www.bioactivemed-nrp.com продължи непрекъснато да се обновява с информация за концепцията, визията, целите и ос постигнатите резултати.

Задача 9.3. Мероприятия за популяризиране на резултатите, информационни кампании, участие в научни форуми

Екипът на НСА организира сателитна научна конференция „***Биологично активни вещества с приложение в спорта***“ (http://icass2019.com/sattelite-symposiums/) в рамките на провеждания от НСА Международен научен конгрес „*Приложни спортни науки*“ и Балканска научна конференция „*Физическо възпитание, спорт и здраве*“, която се проведе на 15-16 ноември, 2019 г. в гр. София (http://icass2019.com/). Бяха изготвени и разпространени покани за участие в събитието и флаери, съдържащи информация за целите и задачите на проекта. Като лектори участваха учени от БАН, Софийския университет, Национална антодопингова лаборатория и НСА.






Списък на участията в информационни кампании, на участията в научни форуми, отразяването в медиите на Програмата и постигнатите индикатори са представени в Приложение 1.

В заключение,* в съответствие с предвидените в работните пакети дейности и задачи, договорът е изпълнен в обема, предвиден в работната програма за първия шестмесечен етап.** Идентифицирани и пречистени са нови съединения от различни растителни и животински източници от България. Започната е работа с нови, неизследвани досега дървесни гъби от парк Витоша. Разработени и сравнени са методите за извличане на БАВ от различни ***фитопродукти и от ***тези с животински произход***, които запазват биологичната им активност. За първи път са получени *in vitro* култури от *Gypsophila trichotoma* и *G. glomerata*. Създадени са успешно надземни и конвенционални (калус и суспензионни) култури от тези видове и по този начин се установи, че е възможно култивирането им при *in vitro* условия. Клетъчното култивиране предлага независимост от географските и сезонни фактори, а продукционните системи за производство предлагат надежден добив и качество на продуктите.

Работи се по създаване на иновативни полимерни средства и доставящи системи, в които са включени екстрактите от БАВ. Получените относно канабидиол експериментални данни потвърждават перспективността на това съединение като антинеопластично средство и такова с невропротективни свойства. Това съединение представлява интерес с оглед на приложимостта му в биофармацевтичната промишленост под формата на наноразмерни криогелни и мицеларни лекарство-доставящи системи със запазена фармакологична активност на природния канабиноид. Продължава селекцията на нискотоксични активни субстанции/системи с бактерио-статичен и/или бактерициден ефект. Започна изследването на ефекта на новите средства от растителен и животински произход върху когнитивните процесите при животни с експериментален модел на Паркинсонова болест. Продължи запълването на библиотека от нови природни компоненти, средства/системи с обещаваща активност с обща цитотоксичност и цитостатичност на панели от малигнени и немалигнени клетъчни линии.

Поради въведеното извънредно положение в страната и предприетите мерки за ограничаване на разпространението на SARS-CoV-2, предизвикващ COVID-19 на територията на България, бяха предприети следните мерки:

Поради намаления бюджет на програмата за втората година, се наложи задачите и работния план да се актуализират, за което МОН беше официално информиран през януари 2020 г. Предвид създадените форсмажорни обстоятелства обаче, ИС на

Програмата обсъди и заяви, че това ще се отрази на изпълнението на заложените задачи и дейности (най-вече като забавяне във времето) – експерименталната работа се извършваше чрез специални разрешения и мерки за сигурност, като при някои от Партньорите имаше забрана за достъп до работните места. Поради затруднените доставки на химикали, материали и оборудване, лабораторната дейност беше силно затруднена. **Командировките бяха и продължават да са невъзможни** и е необходимо разрешение при необходимост тези средства да се пренасочат към други пера, дори и при преразход от разрешените 10%. **Въпреки тези затруднения обаче, по-голямата част от Партньорите продължиха да изпълняват задачите и поетите ангажименти, при стриктно спазване на препоръките на Националния оперативен щаб, доказателство за което са постигнатите до момента резултати.**

Във връзка с възникналата ситуация се наложи част от работата да се преориентира. Обсъдено на ИС беше и вече е включена **НОВА ЗАДАЧА по ННП БиоАктивМед – разработване и тестване на смеси с активен въглен, като защитно средство срещу вирусни инфекции**. Обстоятелствата наложиха бърза реакция и вече са разработени маски, които се изработват от български фирми със съдействието на кризисния щаб и министъра на икономиката. За тази нова задача обаче, са необходими допълнителни средства, тъй като провежданите експерименти не са заложени в бюджета за 2020 г. на Програмата и за момента се използват средства, които са планирани за текущите задачи.

От досега получените резултати може да се каже, че съдържащите канабидиол съставки от индустриален коноп, екстрактите от охлюви и особено от рапани оказват благоприятни за човешкия организъм имуномодулиращи ефекти. По програмата има нови резултати и разработени протоколи и по отношение на екстракти от български лечебни гъби с изразен имуностимулиращ ефект. Намерено е, че и маслото от риган има добър антибактериален ефект не само към Грам-положителните бактерии (какъвто е случая с канабидиола), но и към редица Грам-отрицателни бактерии.

От фармакологична гледна точка особено важно е провеждането на изследвания на комбинации с *Favipiravir* като ефективно средство срещу широк спектър от РНК-ови вируси, включително SARS-CoV-2, и грипни вируси. Интерес представляват и анти-маларийните средства, които се оказва, че също потискат развитието на SARS-CoV-2. Тези изследвания могат да се проведат с човешки клетъчни линии с лимфоиден произход, които имат специфични рецептори по повърхността си, включително за някои

вируси. Досегашните изследвания с хлорокин като инхибитор на афтофагията, може да продължат в една нова светлина, а именно механизма на анти- SARS-CoV-2 действието на този препарат. За всички тези изследвания е необходим допълнителен финансов ресурс.

Всичко това ни дава основание да направим описаното по-долу предложение, което е прието единодушно на присъствен ИС.

ПРЕДЛОЖЕНИЕ ЗА ВКЛЮЧВАНЕ НА ДОПЪЛНИТЕЛНИ АКТУАЛНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ В РАБОТНИЯ ПЛАН,

свързани с разпространението на вируса SARS-CoV-2 (2019-nCoV)

Разпространението на вируса SARS-CoV-2 (2019-nCoV) в световен мащаб налага намирането и въвеждането в клинична употреба на средства, които биха блокирали вирусната репликация и навлизането на вируса в клетките на човека. Коронавирусите кодират някои консервативни мембранно-асоциирани протеини, които са инкорпорирани във вирионите: спайков (*spike, S*), обвиващ (*envelope, E*), мембранен (*membrane, M*) протеини и нуклеопротени (*N*). Тези четири протеина се срещат при всяка коронавирусна линия в поредицата S–E–M–N. Вирусът SARS-CoV-2 представлява обвит РНК-съдържащ бета-коронавирус, при който нуклеиновата киселина е позитивна-sense едноверижна РНК за разлика от вирусите на грипа. Подобно на своите родственици SARS и MERS, геномът на SARS-CoV-2 кодира някои важни не-структурни протеини като: 3-химоторипсин-подобна протеаза, папаин-подобна протеаза, хеликаза и РНК-зависима РНК-полимераза. Освен това вирусният геном обуславя синтеза на структурни протеини като спайковия гликопротеин и някои акцесорни протеини. Четирите не-структурни протеини са ключови ензими, осигуряващи жизнения цикъл на вируса. Спайковият гликопротеин играе важна роля във вирусно-клетъчно рецепторното взаимодействие при навлизането на вируса. Всички тези протеини се приемат за перспективни мишени за разработване на противовирусни терапии. За момента не са намерени лекарства, които да имат доказана клинично ефективност при тази вирусна инфекция. Търсенията на учените са насочени към вече известни противовирусни лекарства като: *Remdesivir*; *Favopiravir*; *Ribavirin*. Двата медикамента могат да действат като инхибитори на РНК-зависимата РНК-полимераза. Първият е тестван при пациенти с ебола, а вторият е ползван при грип. Преминали са клинични изпитвания при хора. Представляват нуклеозидни аналози под формата на аденинови и гуанинови производни, които таргетират РНК-зависимата РНК полимераза и блокират синтеза на вирусна РНК при широк спектър от РНК-вируси, включително човешки коронавируси. Рибавиринът е гуаниново производно, одобрено за лечение на HCV и RSV инфекции. Във високи дози предизвиква анемия и ефективността му при SARS-CoV-2 не е изяснена. Спайковият гликопротеин е обещаваща мишена. Griffithsin е лектин от червени водорасли и се свързва с различни олигозахариди по повърхностните вирусни гликопротеини,

включително gp120 на HIV и спайковия протеин на SARS-CoV-2. Griffithsin е тестван във фаза 1 като гел или клизма с цел превенция на заразяването с HIV.

Пегилираните интерферони IFN-α2аи IFN-α2bca одобрени за лечение на инфекции с HBV и HCV. Възможно е да имат ефект и при пациенти с COVID-19. Още от 2005 г. е известно, че роля на рецептор за SARS вируса играят ACE2 молекулите, експресирани по повърхността на таргетните клетки –а лвеоларен и бронхиален епител и ендотел. Поради това възможността за блокирането на свързването към ACE2 се приема за важно направление в научните търсения. В тази връзка е интересно да се отбележи, че група от учени от Канада съобщават за сигнификантон понижение на рецепторната плътност след третиране с канабидиол-съдържащи екстракти от индустриален коноп. Ключова роля при активирането на спайковия протеин на SARS-CoV-2 играе и една протеинкиназа, означавана като TMPRSS2. Поради гореизложеното предлагаме да бъдат включени следните допълнителни за ННП БиоАктивМед изследвания:

1. Проучване на възможностите за модулация на експресията на ACE2 при спонтанно експресиращи този коронавирусен рецептор клетъчни линии след третиране с екстракти от индустриален коноп и чист канабидиол.

2. Проучване на възможностите за модулация на експресията на ACE2 при спонтанно експресиращи този коронавирусен рецептор клетъчни линии след третиране с екстракти от охлюви и особено от черноморски рапании други, предложени от партньорите и колективите от РП 1.

3. Проучване на възможностите за фармакологична модулация на експресията на модификатора на спайковия протеин на коронавируса SARS-CoV-2 – сериновата протеаза TMPRSS2 в клетъчни линии със спонтанна експресия на протеазата.

4. Изследване на инхибиторната активност на селектирани БАВ и екстракти върху ядрения транскрипционен фактор NF-κB, отговорен за експресията на множество проинфламаторни фактори, отговорни за увреждането на белия дроб и ендотела при COVID-19.

5. Тестване на подбрани БАВ и екстракти за противовирусна активност при модел на COVID-19 *in vitro*.

Хипотезата е, че съществуват ниско токсични биологично активни вещества и екстракти (от индустриален коноп, от охлюви/рапани и др.), които могат да осигурят ефективно намаляване на плътността на рецепторите ACE2, както и да намалят

експресията/ензимната активност на модификатора на спайковия протеин на SARS-CoV-2, означаван като TMPRSS2 и по този начин да редуцират значително вероятността от инфектиране с новия коронавирус, особено при рискови групи пациенти с диабет тип 2 и хипертония. Предполага се разкриването и на инхибиторни свойства по отношение на транскрипционния фактор NF-κB, което може да осигури по-добро овладяване на така наречената „*цитокинова буря*“ при тежки форми на COVID-19.

Очакваните резултати от допълнителните задачи могат да се обобщят по следния начин:

- **Установяване на БАВ/екстракти с влияние върху рецепторната плътност на ACE2 *in vitro*.**
- **Намиране на възможности за намаляване на експресията и активността на TMPRSS2 и оттам на активирането на спайковия протеин на SARS-CoV-2 при човешки клетъчни линии.**
- **Разкриване на влиянието на БАВ/екстракти и комбинации върху активността на ядрения транскрипционен фактор NF-κB с цел редукция на проинфламаторните фактори при COVID-19 в моделни условия.**

Предлагаме, Партньорите които ще работят по новите задачи да използват като източници на финансиране неизразходваните средства за командировки до края на годината и тези от рисковия фонд. Надяваме се и на компенсация през третата година за сметка на намалените през 2020 г. финансови средства.

Списък на участията в информационни кампании, на участията в научни форуми, отразяването в медиите и постигнатите индикатори от изпълнението на Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“

Публикации

1. N. Ilieva , P. Petkov, E. Lilkova, T. Lazarova, A. Dolashki, L. Velkova, P. Dolashka, L. Litov. *In silico study on the structure of novel natural bioactive peptides*, **In:** Large-Scale Scientific Computing, LSSC 2019, I. Lirkov and S. Margenov (Eds.), **Springer Cham**, Switzerland, (**2020**) vol. 11958, pp. 332-339. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41032-2_38. **Q2 (Scopus)**

2. N. Stoyanova, M. Spasova, N. Manolova, I. Rashkov, A. Georgieva, R. Toshkova, *Antioxidant and antitumor activities of novel quercetin-loaded electrospun cellulose acetate/polyethylene glycol fibrous materials*, **Antioxidants** (**2020**) 9, 232; ***Open access article***; https://doi:10.3390/antiox9030232. **IF = 4.52, Q1 (WoS)**

3. D. Momekova, E. Ivanov, S. Konstantinov, F. Ublekov, P. D. Petrov, *Nanocomposite cryogel carriers from 2-hydroxyethyl cellulose network and cannabidiol-loaded polymeric micelles for sustained topical delivery*, **Polymers (2020)**, *12*, 1172; ***Open access article***; https://doi.org/10.3390/polym12051172. **IF = 3.426, Q1 (WoS)**

4. D. Georgieva, K. Ivanova-Mileva, S. Ivanova, B. Kostova, D. Rachev, D. Christova. *Thermoresponsive poly(N-isopropylacrylamide) copolymer networks for galantamine hydrobromide delivery*, **Colloid and Polymer Science (2020)**, *298*, 377–384; https://doi.org/10.1007/s00396-020-04621-8. **Q2 (Scopus)**

5. О. Стоилова, *Национална научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“*, списание Наука, кн. 6/2019, том XXIX, 41-45. http://spisanie-nauka.bg/arhiv/6-2019.pdf

Конференции

1. Dolashki A., Velkova L., Dolashka P., Innovative bioactive compounds and products from garden snail Helix aspersa, „*Биологично активни вещества с приложение в спорта*“, 15-16 ноември, 2019, НСА, София (http://icass2019.com/).

2. Georgieva M., Miloshev G., Present-day genetic understanding of the effects of biologically active substances and adaptogenes used in personalized sport and sports medicine, „*Биологично активни вещества с приложение в спорта*“, 15-16 ноември, 2019, НСА, София (http://icass2019.com/).

3. Petrov L., Chaneva G., Petrova D., Mantovska D., Possibilities of using Nepeta nuda as supplement in sports practice, „*Биологично активни вещества с приложение в спорта*“, 15-16 ноември, 2019, НСА, София (http://icass2019.com/).

4. Alexandrova A., Petrov L., Oxidative stress and role of antioxidants in exercise, „*Биологично активни вещества с приложение в спорта*“, 15-16 ноември, 2019, НСА, София (http://icass2019.com/).

5. Petrov L., Alexandrova A., Kachaunov M., Andonov S., Minkovski K., Izov N., Effects of glutathione supplementation on swimmers' performance, „*Биологично активни вещества с приложение в спорта*“, 15-16 ноември, 2019, НСА, София (http://icass2019.com/).

6. Kalfin R., Lazarova M., Dolashka P., Velkova L., Dolashki A., Tancheva L. Experimental model of Parkinson's disease and protective effects of fresh extract of snail (Helix aspersa). *31st International Neuroscience Online Event* "Discover and Learn the Challenges in Neurology and Neuroscience", July 27, 2020.

7. T. Lazarova, P. Petkov, N. Ilieva, E. Lilkova, L. Litov, *In silico* study of the self-organisation process in mono-component solutions of antimicrobial peptides, *14th Annual Meeting of the Bulgarian Section of SIAM* (December 17-19, 2019, Sofia, Bulgaria).

8. T. Lazarova, P. Petkov, E. Lilkova, L. Litov, N. Ilieva, Self-association of antimicrobial peptides in solution: formation patterns, *12th Conference of the Euro-American Consortium for Promoting the Application of Mathematics in Technical and Natural Sciences* (June 24-29, 2020, online).

9. K. Todorova, A. Georgieva, I. Iliev, V. Dilcheva, I. Vladov, S. Petkova, R. Toshkova and P. Dolashka. *In vivo* toxicity assay and antitumor activity of hemocyanins isolated from *Helix aspersa*, *Helix lucorum* and *Rapana venosa* in experimental *Graffi* myeloid tumor models in hamsters. *The fourteenth workshop biological activity of metals, synthetic compounds and natural products*, December. 2019, Sofia, Bulgaria.

10. I. Iliev, K. Todorova, V. Dilcheva, I. Vladov, A. Georgieva, R. Toshkova, S. Petkova and P. Dolashka. Safety testing of hemocyanins isolated from Helix lucorum, Helix aspersa and

Rapana venosa. *International scientific conference „Tradition and Modernity in Veterinary Medicine”*, 24 – 26. 04. 2020, Yundola, Bulgaria.

11. K. Todorova, V. Dilcheva, I. Vladov, A. Georgieva, I. Iliev, R. Toshkova, S. Petkova and P. Dolashka. Antiparasitic effects of gastropod hemocyanins in murine model of trichinellosis. *International scientific conference „Tradition and Modernity in Veterinary Medicine”*, 24 – 26. 04. 2020, Yundola, Bulgaria.

12. D. Georgieva, B. Kostova, I. Krasteva, A. Shkondrov, A. Georgieva, R. Toshkova. Preparation of complex chitosan-alginate nanoparticles loaded with extract from *Astragalus glycyphyllos* L. and investigation of antitumor effect on *Graffi* tumor-bearing hamsters. *Седми конгрес по фармация с международно участие*, 21-24 ноември, 2019, Боровец, България. ***Получена е Грамота и е присъдена Първа награда за интердисциплинарност на изследването***.

Привлечени млади учени и докторанти – общо 35

1. Елена Иванова, Инна Суликова и Дардана Манга – млади учени към екипа на ИЕМПАМ-БАН.
2. Ервин Иванов, Диляна Христова, Мария Николова – докторанти/млади учени към екипа на МУ-ФФ-София
3. Антониос Трохопулос – постдокторант в МУ-ФФ-София
4. Аделина Македонска, Ася Даскалова, Христо Петков, Мирослав Дангалов, Ивалина Трендафилова, Венцеслав Атанасов, Ася Даскалова, Димитър Койнарев (докторант) – млади учени в екипа на ИОХЦФ-БАН
5. Цвета Лазарова – СУ „Св. Кл. Охридски“ – ФзФ
6. Мария Шрьодер – докторант в ИМолБ-БАН
7. Александър Душков, Александър Цинцаров, Лазар Лазаров, Златина Влахова, Никол Богданова, Силвия Маринова, Румен Стаменов, Елена Кръчмарова, Кристина Малинова – млади учени/студенти в ИМолБ-БАН
8. Димитринка Атанасова и Мария Лазарова – постдокторанти в ИНБ-БАН
9. Десислава Мантовска, Михаела Белухова, Даниел Тодоров и Венелин Цветков – млади учени в екипа на СУ-БФ
10. Елена Лилкова – млад учен в екипа на ИИКТ
11. Явор Данов, Николета Стоянова – млади учени в екипа на ИП-БАН