

**РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ**  
**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ**  
ИНСТИТУТ ПО ОРГАНИЧНА ХИМИЯ С ЦЕНТЪР ПО ФИТОХИМИЯ  
ЛАБОРАТОРИЯ „БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ВЕЩЕСТВА - ПЛОВДИВ“

**АВТОРЕФЕРАТ**

ЗА

ПРИДОБИВАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН

„ДОКТОР“

НА ТЕМА:

**ИЗУЧАВАНЕ НА СТРУКТУРАТА И ИМУНОМОДУЛИРАЩИЯ ПОТЕНЦИАЛ НА  
КИСЕЛИТЕ ХЕТЕРОПОЛИЗАХАРИДИ ОТ ПЕКТИНОВ ТИП В БЪЛГАРСКИ  
ЛЕЧЕБНИ РАСТЕНИЯ**

РЕДОВЕН ДОКТОРАНТ: АС. ИНЖ.-ТЕХН. ЙОРДАН НИКОЛАЕВ ГЕОРГИЕВ

ПРОФЕСИОНАЛНО НАПРАВЛЕНИЕ: 4.2. ХИМИЧЕСКИ НАУКИ

НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ: 01.05.10 „БИООРГАНИЧНА ХИМИЯ, ХИМИЯ НА  
ПРИРОДНИТЕ И ФИЗИОЛОГИЧНО АКТИВНИТЕ ВЕЩЕСТВА“

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ: ДОЦ. Д-Р МАРИЯ ГЕОРГИЕВА КРАЧАНОВА

РЕЦЕНЗЕНТИ:

ПРОФ. Д-Р ПАВЛИНКА АЛЕКСАНДРОВА ДОЛАШКА (ИОХЦФ-БАН)

ПРОФ. Д-Р ИЛИЯ НИКОЛОВ ИЛИЕВ (ПУ „ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“)



ДЕКЕМВРИ, 2017 Г.

ГР. ПЛОВДИВ

Настоящият дисертационен труд е разработен в ЛБАВ-Пловдив при ИОХЦФ-БАН. Част от фитохимичните изследвания бяха извършени в Лабораторията по експериментална хроматография и маспектрометрия при ИОХЦФ-БАН. Пречистването на полизахаридите беше направено в Университета по хранителни технологии в гр. Пловдив. Структурните изследвания бяха извършени в Университета на Осло (Кралство Норвегия). Биологичните анализи бяха проведени в Института по микробиология „Стефан Ангелов“ при БАН, Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“, Университета „Китасато“ в гр. Токио (Япония) и Института по биофизика към Чешката академия на науките в гр. Бърно.

Част от резултатите от дисертационния труд, представени под заглавието „Кисели хетерополизахариди с имуномодулиращ и противовъзпалителен ефект от български билки“, бяха избрани за най-добро научно-приложно постижение на ИОХЦФ-БАН за 2017 г.

Дисертацията е написана на общо 270 печатни страници (шрифт: Times New Roman, размер: 12, междуредово разстояние: 1.5 cm и отстояния от всички страни: 2.5 cm). Литературният обзор е написан на 49 стр., като той съдържа 2 таблици, 1 схема и 7 фигури. Експерименталната част е написана на 182 стр. Тя съдържа 18 таблици, 4 схеми, 58 фигури (повечето с подточки) и 7 снимки (някои с подточки). Библиографската справка обхваща 404 литературни източника, от които 225 са публикувани в периода 2010-2017 г.

Дисертационният труд беше обсъден на разширено заседание на колоквиума „Химия на природните вещества“ в ИОХЦФ-БАН на 10.11.2017 г.

Изпитът по защитата на дисертационния труд ще се състои на .....2018 г. () от ... ч. в зала „Акад. Богдан Куртев“ (№ 111), ет. 1, в ИОХЦФ-БАН, ул. „Акад. Георги Бончев“ бл. 9, жк „Гео Милев“. Изпитът ще се проведе на открито заседание пред Научно жури в следния състав:

Проф. д-р Павлинка Александрова Долашка (ИОХЦФ-БАН) – Председател  
Проф. д-р Илия Николов Илиев (Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“)  
Чл.-кор. проф. д-р Атанас Иванов Павлов (Университет по хранителни технологии и Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН)  
Проф. д-р Пантелей Петров Денев (Университет по хранителни технологии)  
Доц. д-р Мария Георгиева Крачанова (ИОХЦФ-БАН)

Резервни членове:

Доц. д-р Калина Иванова Алипиева (ИОХЦФ-БАН)  
Доц. д-р Антон Минчев Славов (Университет по хранителни технологии)

**Номерацията на фигурите в автореферата не съответства на тази в пълния текст на дисертацията.**

Материалите по защитата са на разположение в канцеларията на ИОХЦФ-БАН (стая № 206) и на интернет страницата на института ([www.orgchm.bas.bg](http://www.orgchm.bas.bg)), в секция „Процедури“ и подсекция „Процедури по придобиване на научни степени“.

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

**АЕ**, абсорбционни единици; **АГ**, арабиногалактан; **АОХ**, анионообменна хроматография; **АП**, алтернативен път; **АУС**, анхидроуроново съдържание; **БА**, биологично активни; **ЕРХ**, елиминираща по размери хроматография; **КП**, класически път; **лавандулов ПЗК**, ПЗ-ен комплекс от обикновена лавандула; **лавандулов ПЗК2**, лавандулов ПЗ-ен комплекс, получен след продължителна алкохолна обработка на лавандула ПЗК; **липов ПЗК**, ПЗ-ен комплекс от сребролистна липа; **липов ПЗК2**, липов ПЗ-ен комплекс, получен след продължителна алкохолна обработка на липовия ПЗК; **ЛПЗ**, липополизахариди; **ПП**, Пайерови плаки; **ПЗ**, полизахарид; **ПЗСК**, полизахарид-съдържащ комплекс; **ПУС**, полиуронидно съдържание; **РГ-I** или **-II**, рамногалактуронан тип I или II; **РФК**, реактивни форми на кислорода; **СК**, система на комплемента; **СА**, степен на ацетилиране; **СМ**, степен на метоксилиране; **СЧТ**, стомашно-чревен тракт; **ФЕ**, флуоресцентни единици; **ХЛ**, хемилуминесценция; **ХГ**, хомогалактуронан; **ЯМР**, ядрено-магнитен резонанс.

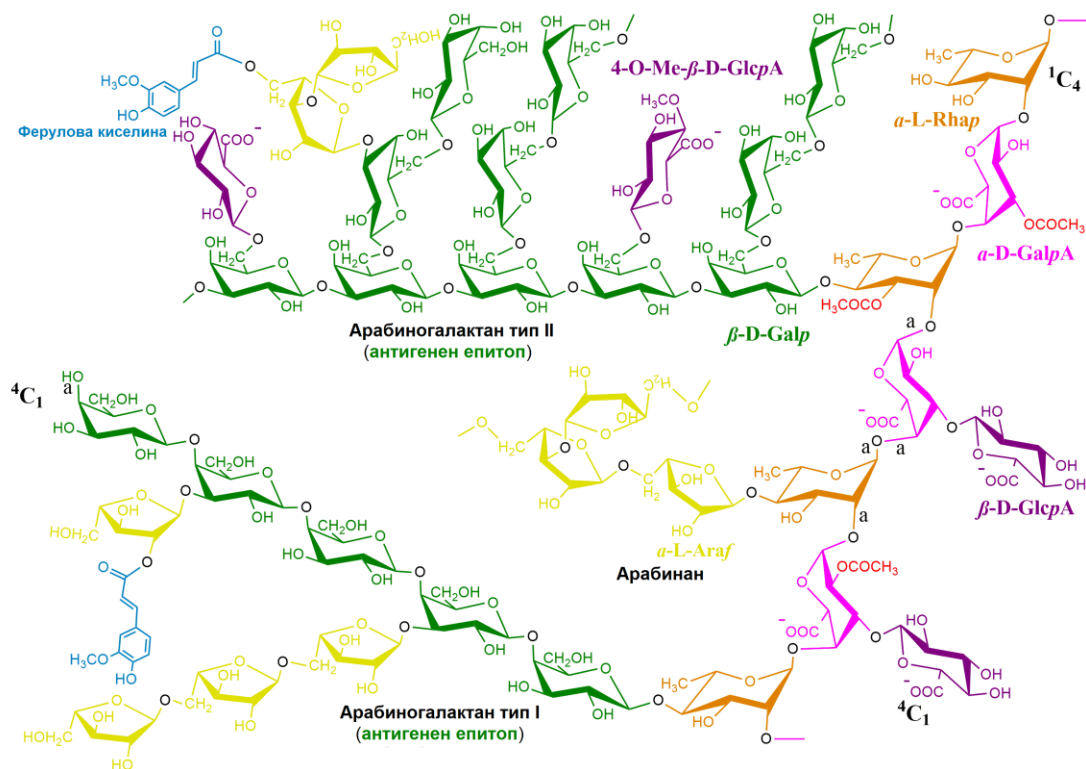
**CD18**, маркер за  $\beta_2$ -интегрин; **CD62L**, маркер за L-селектин; **chPP-L**, **chPS-L1** и **chPS-L2**, полифенолна фракция, първа и втора пектинови фракции, получени след хроматографско разделяне и пречистване (ЕРХ) на лавандулов ПЗК2; **DSS**, превод от англ. - натриев 4,4-диметил-4-силапентан-сулфонат; **fMLP**, от англ. - N-формилметионил-левцил-фенилаланин; **FT-IR**, от англ. - инфрачервена спектроскопия с Фурие трансформация; **GlcA-РГ-I**, глюкуронидиран РГ-I; **HORAC**, от англ. - hydroxyl radical averting capacity; **IC<sub>50</sub>**, концентрация, даваща 50% хемолiza на еритроцитите; **iNOS**, от англ. - индуцируема азотен оксид синтаза; **Kdo**, от англ. - 3-деокси-D-мано-2-октулозонова киселина; **NL-PSI**, ПЗ-на фракция, получена след хроматографско разделяне и пречистване (АОХ) на коприва-лист ПЗСК; **NR-PSI-IV**, ПЗ-ни фракции, получени след хроматографско разделяне и пречистване (АОХ) на коприва-корен ПЗСК; **ORAC**, от англ. - oxygen radical absorbance capacity; **OZP**, от англ. - опсонизирани зимосанови частици; **PMA**, от англ. - 12-миристат 13-ацетат; **PSI-III**, пектинови фракции, получени след хроматографско разделяне и пречистване (АОХ) на липов ПЗК2.

## I. ЗНАЧЕНИЕ И АКТУАЛНОСТ НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Скрининговите проучвания върху имуномодулиращата активност на лечебните растения са съсредоточени основно върху малките молекули. Изследванията върху пектиновите ПЗ показат, че те са също отговорни за проявлението на имуномодулираща активност от билките (Wangenstein et al., 2015; Yamada & Kiyohara, 2007). Това е така, защото пектиновият биосинтез в растенията е важен не само за клетъчния интегритет и растеж, но и за поддържане на техния имунитет (Bethke et al., 2016). Пектините са едни от най-сложно устроените хетероглигани на Земята и въпреки че са били открити преди повече от 2 века от Vauquelin (1790), тяхната фина полимерна структура все още не е разгадана. Те са изградени основно от ХГ, последван от РГ-I, малки количества РГ-II и различни други заместени галактуронани (Schols & Voragen, 2002). От физиологична гледна точка, човешкият организъм е изградил поносимост към пектините, защото те присъстват в плодовете, зеленчуците и билките, които ние консумираме. Значението на пектините за поддържането на човешкото здраве се определя от техните благоприятни ефекти върху храносмилателната, отделителната, сърдечно-съдовата, ендокринната, нервната и дихателната системи (Chen et al., 2011; Endress, 2011; Fan et al., 2012; Šutovská et al., 2013; Xie et al., 2015). Сложната пектинова макромолекула се „разпознава“ от имунната система по сходен начин на микробните клетъчностенни ПЗ, но имунния отговор от тяхното действие е различен от този на микробните антигени. Ето защо растителните ПЗ се разглеждат като имитиращи антигени. В присъствие на микробни ПЗ пектините могат да проявят противовъзпалителна активност (вж. Глави 4-6). Най-важни за проявлението на имуномодулираща активност от пектините са АГ-I и -II структурите, които са ковалентно свързани към O-4 на Rha в РГ-I (**фиг. 1**). Ето защо структурните особености на РГ-I са основен обект в настоящата дисертацията.

Научно доказана техника за приготвяне на имунологично активни кисели ПЗ е варенето на билкови смеси с вода (Kiyohara et al., 2011). Затова имуномодулиращите пектини присъстват частично и в най-консумираната в света течност след водата – билковият чай. Естественият начин за модулиране на имунната система е чрез храните и напитките. Пектините преминават лесно през СЧТ и въпреки че се характеризират с ниска резорбция в кръвта, те могат да взаимодействат с мукозната имунна система в тънките черва. Смята се, че това става чрез свързване на ПЗ-те към повърхностните рецептори на имунокомпетентните епителни клетки

(без резорбция) и пиноцитозните М-клетки (с резорбция) от ПП в чревната лигавица (Matsumoto et al., 2010; Kiyohara et al., 2011). ПП съдържат В-, Т-клетки и фагоцитарни левкоцити, чиято активност може да бъде повлияна пряко или непряко от билковите пектини (Inngjerdingen et al., 2008; Yamada & Kiyohara, 2007). Пектините активират оксидативният взрив и фагоцитозата при неутрофилите и макрофагите, като по този начин повлияват вродения имуен отговор (Popov & Ovodov, 2013). Активираните макрофаги и дендритни клетки могат да стимулират клетките на придобития имунитет (Liu et al., 2011). ПЗ-те активират също и СК по КП и АП, която е пряко свързана с имунната система (Wang et al., 2016). Интестиналните имуномодулиращи ефекти на билковите пектини разширяват класическото схващане за влиянието на хранителните влакнини за поддържане на човешкото здраве. Билковите ПЗ могат да бъдат полезни при третирането на инфекциозни и ракови заболявания, като активатори на имунната система, и при хронични възпалителни неразположения, като супресори на имунната система. Поради тези ефекти пектините са включени и в клинични изследвания (Keizman et al., 2017). Допълнително при приготвянето на чай, ПЗ-те се екстрахират заедно с полифенолите, с които образуват БА комплекси с комбинаторни ефекти (Jakobek, 2015).



**Фиг. 1** Структура на имунологично активния рамногалактуронан тип I.

Натрупването на данни, показващи имуномодулиращата роля на ПЗ-те спомага за популяризирането на тяхното действие и цели по-широката им употреба. Химичният състав и имуномодулиращата активност на пектиновите ПЗ, получени от редица азиатски и африкански билки, са документирани в литературата (Yamada & Kiyohara, 2007; Wangenstein et al., 2015). Липсва обаче организирано, мащабно изследване на пектините от редица традиционно използвани европейски (и в частност български) билки с широка или по-специфична употреба. При изследване на имуномодулиращата активност на ПЗ-те рядко се споменава за тяхната интестинална имуномодулираща активност, която е от съществено значение за евентуалното *in vivo* проявление на ефектите. Налични са вече данни за антиоксидантната активност на балканските билки и горските плодове, но е оскъдна информацията относно тяхното имуномодулиращо действие (Kratchanova et al., 2010; Denev et al., 2014).

Имуномодулиращият потенциал на ПЗ-те може да бъде използван чрез влагането им в иновативни продукти с приложение във функционалното и диетичното хранене. България е известна на световните пазари със своите ценни и висококачествени билки, които са търсена

суровина за задоволяване на нуждите на глобалната фармацевтична, козметична и хранителна промишлености (Vasisht et al., 2016). От членството ни в ЕС се появиха сериозни финансови механизми за осъществяване трансфер на знания от науката към бизнеса. Получаването на БА вещества, като ПЗ-те, под формата на нови продукти от организирано отглеждани растения, е един от начините за устойчиво повишаване на брутния вътрешен продукт на страната. От това произтичат и социалните ползи за развитието на едно общество. Примери за търговски продукти, съдържащи имуномодулиращи ПЗ са Pectasol-C, Vazoton<sup>®</sup>, екстракт от *Astragalus spp.* и Кампо екстрактите Juzen-taiho-to и Hochuekkito. Тенденциозното нарастване на приложението на ПЗ-те в храните и медицинските нанотехнологии изисква по-детайлно изучаване на тяхната структура и ефекти върху организма. На ПЗ-те вече се гледа не само като на технологични добавки в храните и лекарствата, но и като на физиологично активни съставки. Следователно изучаването на БА ПЗ е важен и актуален научен проблем, съпътстващ развитието на човечеството.

## II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

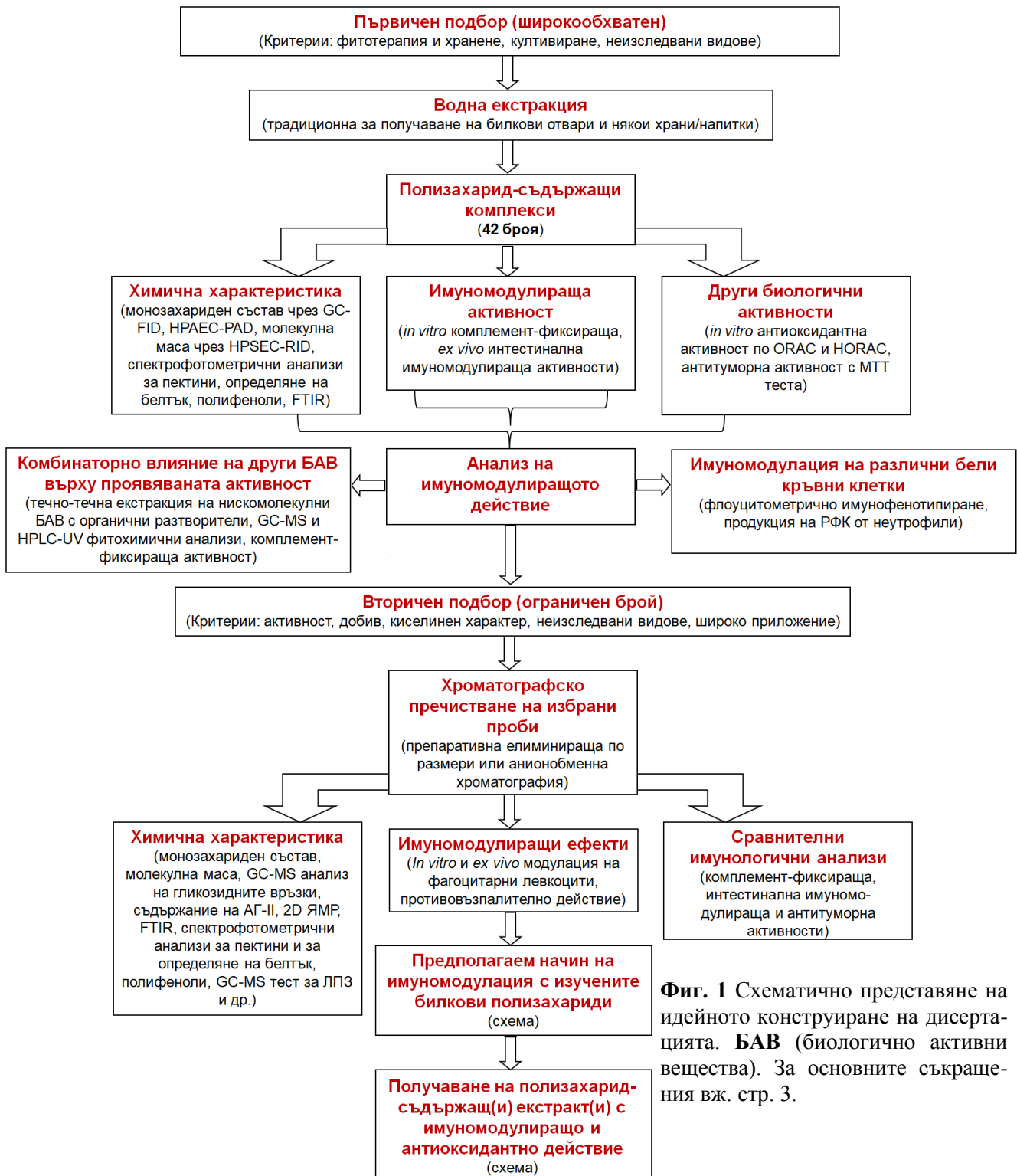
Целта на настоящия дисертационен труд е да се изучат киселите хетерополизахариди от пектинов тип в традиционни и перспективни за България лечебни растения, и да се определи техният имуномодулиращ потенциал с цел приложението им във фитотерапията, здравословното и лечебното хранене на човека.

За постигането на поставената цел бяха изпълнени следните задачи:

1. Подбор по критерии (**фитотерапия и хранене, култивиране, неизследвани видове**) на традиционни и перспективни за България лечебни растения. (Глава 1)
2. Изолиране и охарактеризиране на химичния състав на 42 водно-екстрахируеми ПЗСК-а. (Глава 1)
3. Провеждане на двустъпален скрининг за оценяване на имуномодулиращата активност на 42-та ПЗСК-а чрез определяне на тяхната *in vitro* комплемент-фиксираща и *ex vivo* интестинална имуномодулираща активности. (Глава 1)
4. Провеждане на допълнителен скрининг за определяне на *in vitro* антиоксидантната активност на ПЗСК-и с цел определяне на техния двуфункционален потенциал в биологичните системи. (Глава 1)
5. Изследване комбинаторното влияние на някои съпътстващи нискомолекулни БА съединения върху проявяваната имуномодулираща активност от избрани, активни ПЗСК-и. (Глава 2)
6. Задълбочено изследване на имуномодулиращите ефекти върху различни бели кръвни клетки на избрани, активни ПЗСК-и с потенциално приложение. (Глава 3)
- 6.1. Допълнително оценяване на тяхната *in vitro* антитуморна активност.
7. Задълбочено изучаване на подбрани по критерии (**активност, добив, киселинен характер, неизследвани видове, широко приложение**) ограничен брой перспективни ПЗ-ни проби, както следва (Глави 4-6):
  - 7.1. Хроматографско пречистване на избраните ПЗ-ни проби;
  - 7.2. Изучаване на химичната структура на пречистените ПЗ-ни фракции чрез необходимите за тази цел солидни аналитични подходи;
  - 7.3. Сравнителни анализи за оценка на имуномодулиращата и антитуморната активности на пробите преди и след пречистване:
    - 7.3.1. Оценяване на комплемент-фиксиращата активност на избрани проби;
    - 7.3.2. Оценяване на интестиналната имуномодулираща активност;
    - 7.3.3. Оценяване на антитуморната активност на избрани проби.
  - 7.4. Изучаване на имуномодулиращите ефекти на пречистените ПЗ чрез:
    - 7.4.1. *In vitro* и *ex vivo* модулация на фагоцитарни левкоцити (неутрофили и макрофаги);
    - 7.4.2. Изучаване на противовъзпалителния потенциал на ПЗ-те в моделни *in vitro* и *ex vivo* системи (с ЛПЗ, РМА, ОЗР).

8. Създаване на обобщен модел за начина на имуномодуляция с изучените билкови пектинови ПЗ, с потенциално приложение във фитотерапията, здравословното и лечебното хранене на човека.
- 8.1. Разработване на лабораторна схема за получаване на ПЗ-съдържащ(и) екстракт(и) с имуномодулиращо и антиоксидантно действия.
9. Популяризиране на получените резултати.
- 9.1. Представяне на резултатите на конференции;
- 9.2. Публикуване на максимална част от получените резултати.

### III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ



**Фиг. 1** Схематично представяне на идейното конструиране на дисертацията. БАВ (биологично активни вещества). За основните съкращения вж. стр. 3.

## IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

### Глава 1

#### Подбор на имунологично активни, водно-екстрахируеми, полизахарид-съдържащи комплекси от традиционни и перспективни за България лечебни растения

##### Резюме

Посредством двукратна екстракция с кипяща вода и утаяване с етанол бяха получени 42 ПЗСК-а от различни части (надземни части, цветове, плодове, листа, корени) на 34 лечебни растения. В резултат на определяне на над 50% от химичния състав на комплексите беше установено, че повечето от тях са богати на кисели ПЗ от пектинов тип. При определяне на *in vitro* комплемент-фиксиращата активност по КП и АП, и *ex vivo* интестиналната имуномодулираща активност на комплексите, се откриоха 20 активни проби по единия и/или двата скринингови теста. Пробите показаха по-висока антикомплементарна активност по АП в сравнение с КП. Допълнително беше определена и *in vitro* антиоксидантната активност на комплексите по ORAC и HORAC методите. При спазване на въведените критерии (активност, добив, кисел характер, неизследвани видове, широко използване) като перспективни имунологично активни ПЗСК-и бяха подбрани тези от: коприва (корен и лист), тученица (надземна част), липа (цвят) и лавандула (цвят). Комплексът от коприва (корен) показва най-високата комплемент-фиксираща активност по АП с  $IC_{50} = 21.1 \mu\text{g/mL}$  и най-високата интестинална имуномодулираща активност при  $100 \mu\text{g/mL}$ , изразена като стимулиране пролиферацията на костно-мозъчни клетки и продукцията на IL-6 от клетки на чревните ПП. С изключение на комплекса от коприва (корен), в който от ПЗ-те са застъпени предимно неутралните глюкани, в другите избрани проби преимуществен дял заемат пектиновите ПЗ. ПЗСК-и от коприва (лист) и лавандула показаха и известна антиоксидантна активност. Резултатите, от проведеното мащабно изследване, имат реален потенциал за развитие на българската икономика чрез култивирането на лечебни растения и разработването на нови функционални храни и напитки от тях, с приложение в рационалното и диетичното хранене.

Целта на настоящата глава е да се изследва химичният състав, имуномодулиращата и антиоксидантната активност на ПЗСК-и, получени от европейски лечебни растения.

### 3. Резултати

#### 3.1. ПУС в изходните суровини и химична характеристика на получените ПЗСК-и

Включените в скрининговото изследване 34 растения бяха разделени основно на 3 групи, в зависимост от своето приложение в бита на човека: *Лечебни растения със специфично приложение* (А), *Лечебни растения с по-широко приложение* (Б) и *Лечебни горски плодове* (В) (табл. 1). Билките бяха подбрани по критериите представени на **фиг. 1**, в секция III. „Материали и методи“. От различни части на 34-те билки бяха получени общо 42 водно-екстрахируеми ПЗСК-а. За да се оцени наличието на кисели ПЗ в изходните суровини беше определено тяхното ПУС. От данните в **табл. 1** по-долу се вижда, че всички изследвани части от растенията съдържат кисели ПЗ, като ПУС варира между 5.9% за ягода (плод) и 22.2% за липовия цвят. За получаването на ПЗСК-и беше проведена двукратна екстракция с кипяща вода, която намира приложение при приготвянето на билкови екстракти в традиционната японска Кампо медицина и индийската „Аюрведа“. Екстрахируемостта на ПЗ-те се движи между 28.7% за бял трън (семя) и 84.8% за шипка (люспа), като тя е над 50% за 32 от 40-те различни суровини. Медианите за ПУС в трите групи са близки: 15.1% (А), 15.9% (Б) и 14.8% (В), а за екстрахируемостта са 61.0% (А), 64.8% (Б) и 63.9% (В), съответно. От тези данни може да се каже, че клетъчностенните кисели ПЗ са достъпни за екстрахиране с вода, което е от особено значение за приложимостта на получените резултати от последващия имунологичен скрининг на пречистените ПЗ. Добивите на ПЗСК-и варират между 1.7% за червен лофант (надземна част) и 16.0% за шипка (люспа). Пробите като липа (цвят), лайка (цвят), коприва (лист), глухарче (корен), невен (цвят), черен бъз (цвят), шипка (люспа) и др. се характеризират с висок добив и в тях присъстват преимуществено кисели ПЗ. Комплексите от черен оман, бял оман и тученица също бяха получени в по-големи количества и съдържат различни ПЗ.

**Таблица 1.** Полиуронидно съдържание (ПУС) в изходните суровини и крайните остатъци, и добив на водните полизахарид-съдържащи комплекси (ПЗСК)

Водни ПЗСК-и		Ботаническо наименование	ПУС суровина [% СВ]	ПУС остатък [% СВ]	Екстрахируемост [%]	Добив ПЗСК [% СВ]
<i>Лечебни растения със специфично приложение (Група А)</i>						
1	Бабини зъби (н. ч.)	<i>Tribulus terrestris</i> L. (Zygophyllaceae) а	14.6	7.8	46.6	2.8
2	Бял имел (н. ч.)	<i>Viscum album</i> L. (Santalaceae) а	10.9	4.9	55.0	3.9
3	Бял трън (семе)	<i>Silybum marianum</i> L. (Asteraceae) а	10.8	7.7	28.7	4.2
4	Върбинка (н. ч.)*	<i>Verbena officinalis</i> L. (Verbenaceae) а	18.4	6.8	63.0	3.0
5	Камшик (н. ч.)	<i>Agrimonia eupatoria</i> L. (Rosaceae) а	15.6	6.1	60.9	2.8
6	Котешка стъпка (н. ч.)*	<i>Clinopodium vulgare</i> L. (Lamiaceae) а	19.1	6.3	67.0	3.2
7	Лавандула (цвят)*	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill. (Lamiaceae) а	15.5	6.6	57.4	3.2
8	Невен (цвят)	<i>Calendula officinalis</i> L. (Asteraceae) а	16.1	3.9	75.8	6.6
9	Оман – бял 1-ва фр. (корен)	<i>Inula helenium</i> L. (Asteraceae) а	10.1	4.4	56.4	5.9
10	Оман - бял 2-ра фр. (корен)					1.1
11	Оман – черен (корен)	<i>Symphytum officinale</i> L. (Boraginaceae) а	12.4	3.2	74.2	12.9
12	Петопръстник 1-ва фр. (н. ч.)	<i>Potentilla</i> sp. L. (Rosaceae) б	15.7	6.1	61.1	2.5
13	Петопръстник 2-ра фр. (н. ч.)					0.6
14	Сапуниче (н. ч.)*	<i>Saponariae rubrae</i> L.(Caryophyllaceae) а	14.6	4.9	66.4	4.0
15	Цариче (н. ч.)*	<i>Alchemilla vulgaris</i> L.(Rosaceae) а	17.3	5.9	65.9	4.6
16	Червен лофант (н. ч.)*	<i>Agastache barberi</i> Gronov. (Lamiaceae) а	14.4	6.4	55.6	1.7
Водни ПЗСК-и		Ботаническо наименование	ПУС суровина [% СВ]	ПУС остатък [% СВ]	Екстрахируемост [%]	Добив ПЗСК [% СВ]
<i>Лечебни растения с широко приложение (Група Б)</i>						
17	Бял равнец (цвят)	<i>Achillea millefolium</i> L. (Asteraceae) а	20.6	8.1	60.7	2.2
18	Глухарче (корен)	<i>Taraxacum</i> sp. F.H. Wigg. (Lactuceae) б	17.9	4.3	76.0	9.6
19	Жълт кантарион (н. ч.)	<i>Hypericum perforatum</i> L. (Clusiaceae) а	14.6	5.1	65.1	2.7
20	Коприва (лист)*	<i>Urtica dioica</i> L. (Urticaceae) а	17.8	6.8	61.8	4.2
21	Коприва (корен)		12.9	5.6	56.6	3.4
22	Лайка (цвят)	<i>Matricaria chamomilla</i> L. (Asteraceae) а	20.1	4.2	79.1	4.7
23	Липа (цвят)	<i>Tilia tomentosa</i> Moench. (Tiliaceae) в	22.2	6.5	70.7	6.1
24	Мащерка (н. ч.)	<i>Thymus vulgaris</i> L. (Lamiaceae) а	15.4	7.2	53.2	2.3



25	Мурсалски чай (н. ч.)*	<i>Sideritis scardica</i> L. (Lamiaceae) а	18.0	5.6	68.9	2.7
26	Риган - бял (н. ч.)*	<i>Origanum heracleoticum</i> L. (Lamiaceae) а	15.9	5.6	64.8	3.3
27	Риган - червен (н. ч.)	<i>Origanum vulgare</i> L. (Lamiaceae) а	13.3	7.9	40.6	1.8
28	Салвия (н. ч.)	<i>Salvia</i> sp. L (Lamiaceae) б	14.3	6.9	51.7	2.7
29	Тученица (н. ч.)	<i>Portulaca oleracea</i> L. (Portulacaceae) в	14.1	3.3	76.6	8.6
Водни ПЗСК-и		Ботаническо наименование	ПУС суровина [% СВ]	ПУС остатък [% СВ]	Екстрахируемост [%]	Добив ПЗСК [% СВ]
<b>Лечебни горски плодове (Група В)</b>						
30	Арония (плод)	<i>Aronia melanocarpa</i> (Michx.) Elliott (Rosaceae) а	х (д)	х		2.2
31	Арония (лист)		15.4	6.3	59.1	4.3
32	Кисел трън (плод)	<i>Berberis vulgaris</i> L.(Berberidaceae) г	н.а.	4.1		3.7
33	Къпина (плод)	<i>Rubus</i> sp. L.(Rosaceae)	9.0	2.8	68.9	4.4
34	Къпина (лист)*	б	17.7	5.9	66.7	1.9
35	Малина (плод)	<i>Rubus</i> sp. L. (Rosaceae)	х	х		3.4
36	Малина (лист)	б	19.8	7.6	61.6	3.9
37	Офика (плод)	<i>Sorbus</i> sp. L.(Rosaceae) б	6.6	4.0	39.4	2.2
38	Черен бъз (плод)	<i>Sambucus nigra</i> L. (Adoxaceae) г	6.0	2.9	51.7	6.3
39	Черен бъз (цвят)		16.0	3.7	76.9	5.3
40	Шипка (люспа)	<i>Rosa canina</i> L. (Rosaceae) г	15.8	2.4	84.8	16.0
41	Ягода (плод)	<i>Fragaria</i> sp. L. (Rosaceae) б	5.9	2.0	66.1	5.6
42	Ягода (лист)*		14.1	7.2	48.9	3.2

\*Неизследван ПЗ състав; Застрашен вид е само №25; Култивирани в България: №1, 3, 5, 7-9, 16, 17, 19, 20, 22-28, 30, 33, 35, 37, 40, 41; Защитени видове: №1, 2, 4-6, 9, 11, 12, 14, 17-19, 23, 25, 27-29, 32, 37, 38; Препоръчани от фитотерапевт: №3, 4, 6, 14, 15, 18, 32; (а)По данни на производителя; (б)Липсва информация; (в)Определено от ботаник; (г)Определено по външни белези; (д)Проблем с определянето поради естеството на пробата; н.а. – не е анализирано.

Не се откриват данни за ПЗ-ния състав на лавандула, мурсалски чай, сапуниче, върбинка, цариче, листата на горските плодове (с изключение на малината) и копривата, лофант, бял риган и котешка стъпка. От данните за въглехидратния състав се вижда, че получените ПЗСК-и съдържат смес от кисели и неутрални (хетеро)полизахариди (табл. 2). Намерените монозахариди в билковите ПЗСК-и могат да се подредят в следния ред, в зависимост от количеството, в което е застъпен всеки мономер: GalA, Ara, Gal, Glc, Rha, Man, Xyl, Fuc. От това подреждане на първите три монозахарида GalA, Ara и Gal, както и от присъствието на Rha може да се заключи, че в пробите преобладават киселите ПЗ от пектинов тип. Доминирането на GalA подсказва преимуществото на ХГ-я фрагмент в комплексите, а високото съдържание на Ara и Gal, заедно с наличието на Rha подсказват за присъствието на имунологично активните АГ-ви структури от страничните вериги на РГ-І. В пробите се откриват още Glc и Man, които са свързани с наличието на глюкоани, глюкоманани и комбинирания с други монозахариди. С най-високо съдържание на Glc (44.0%) се откроява комплексът от коприва (корен), а този от киселия трън (плод) с най-голямо количество на Man (19.2%). Пробите от корените на бял оман, черен оман и глухарче се характеризират с високо съдържание едновременно на Glc и Man, като част от които е епимеризирала Fru. Посредством качествена реакция по метода с ванилин-сярна киселина беше потвърдено, че тези ПЗСК-и са богати на инулин.

**Таблица 2.** Въглехидратен състав, молекулна маса, съдържание на белтък и общи полифеноли в получените билкови ПЗСК-и.

Лечебни растения със специфично приложение (Група А)		Монозахариден състав (като алдитол ацетати)														
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	H3(б)	GalA	АУС(в)	ОЗ(г)	СМ(д)	M <sub>w</sub> [Da] (%)	Белтък	ОПФ(е)
		[w/w% СВ] (ж)														
1	Бабини зъби (н. ч.) (а)	2.6	0.1	4.7	2.7	1.4	6.1	4.5	22.1	23.4	27.5	49.6	н.а.	1.66×10 <sup>6</sup> (2.2) 1.14×10 <sup>4</sup> (94.6) 0.92×10 <sup>3</sup> (3.2)	11.0	4.0
2	Бял имел (н. ч.)	1.2	0.2	15.4	0.8	1.6	5.9	3.9	29.0	24.3	30.6	59.6	61.6	1.49×10 <sup>4</sup>	6.0	4.4
3	Бял трън (семе)	0.2	+(з)	4.8	0.7	0.5	2.2	1.0	9.4	н.а.	0.7	10.1	н.а.	1.51×10 <sup>6</sup> (9.3) 8.40×10 <sup>3</sup> (90.7)	22.7	2.3
4	Върбинка (н. ч.)	2.4	+	4.9	1.1	2.7	6.2	4.0	21.3	28.0	34.0	55.3	н.а.	1.31×10 <sup>4</sup>	6.5	4.9
5	Камшик (н. ч.)	2.5	0.2	4.3	1.6	1.4	8.1	4.7	22.8	21.2	28.0	50.8	49.5	1.89×10 <sup>6</sup> (4.5) 2.02×10 <sup>4</sup> (95.5)	9.7	13.1
6	Котешка стъпка (н. ч.)	1.1	0.2	5.8	1.8	2.1	5.4	4.4	20.8	21.0	30.0	50.8	н.а.	1.39×10 <sup>6</sup> (1.2) 9.05×10 <sup>3</sup> (98.8)	31.1	19.8
7	Лавандула (цвят)	0.7	0.1	4.3	0.8	0.9	5.0	2.9	14.7	35.8	37.0	51.7	68.5	1.55×10 <sup>6</sup> (2.5) 1.54×10 <sup>4</sup> (97.5)	13.4	11.0
8	Невен (цвят)	1.2	+	4.8	0.9	0.9	4.3	2.3	14.4	47.8	52.0	66.4	64.2	5.59×10 <sup>4</sup>	3.1	2.5
9	Оман – бял 1-ва фр. (корен)	0.2	+	3.3	0.3	9.4	1.6	16.4	31.2	15.2	16.5	47.7	45.0	5.17×10 <sup>4</sup> (9.7) 2.88×10 <sup>3</sup> (90.3)	4.5	2.8
10	Оман - бял 2-ра фр. (корен)	0.1	+	1.6	0.2	14.1	1.0	23.1	40.1	5.6	9.2	49.3	35.1	5.32×10 <sup>4</sup> (3.1) 3.09×10 <sup>3</sup> (96.9)	1.9	1.7
11	Оман – черен (корен)	0.1	н.н.	1.1	0.4	19.0	0.7	28.6	49.9	4.6	5.2	55.1	58.2	4.16×10 <sup>3</sup>		1.4
12	Петопръстник 1-ва фр. (н. ч.)	1.8	+	4.0	1.0	1.0	5.6	4.5	17.9	14.5	18.9	36.8	36.7	1.96×10 <sup>6</sup> (10.3) 5.60×10 <sup>4</sup> (13.1) 0.62×10 <sup>4</sup> (76.6)	6.8	25.8
13	Петопръстник 2-ра фр. (н. ч.)	2.8	+	3.2	1.2	0.3	7.6	2.3	17.4	21.2	27.0	44.4	39.3	5.13×10 <sup>4</sup> (37.2) 1.75×10 <sup>4</sup> (20.7) 1.05×10 <sup>4</sup> (42.1)	4.9	15.8
14	Сапуниче (н. ч.)	1.2	0.2	7.0	1.4	2.6	9.2	3.6	25.2	14.5	20.9	46.1	н.а.	1.28×10 <sup>6</sup> (5.3) 1.37×10 <sup>4</sup> (94.7)	17.0	4.4
15	Цариче (н. ч.)	1.1	0.1	2.3	0.8	1.2	4.3	9.4	19.2	9.7	15.1	34.3	н.а.	5.21×10 <sup>4</sup> (25.6) 5.08×10 <sup>3</sup> (74.4)	14.7	27.8
16	Червен лофант (н. ч.)	1.6	+	6.6	0.5	1.0	7.3	4.9	21.9	40.7	46.9	68.8	61.7	1.91×10 <sup>4</sup>	7.63	4.6

<i>Лечебни растения с по-широко приложение</i> <b>(Група Б)</b>		Монозахариден състав (като алдитол ацетати)															
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	H3(б)	GalA	AУС(в)	O3(г)	СМ(д)	M <sub>w</sub> [Da] (%)	Белтък	ОПФ(е)	
		[w/w% СВ] (ж)															
17	Бял равнец (цвят)	1.2	0.1	5.1	1.2	0.4	6.3	1.3	15.6	33.7	35.0	50.6	80.3	1.81×10 <sup>4</sup>	5.9	5.9	
18	Глухарче (корен)	0.9	0.1	6.1	0.3	6.0	3.9	9.5	26.8	28.5	33.4	60.2	н.а.	8.41×10 <sup>4</sup> (39.8) 3.77×10 <sup>3</sup> (60.2)	4.7	2.6	
19	Жълт кантарион (н. ч.)	1.7	0.1	7.5	1.5	1.5	7.2	4.3	23.8	28.9	35.9	59.7	62.4	5.72×10 <sup>4</sup> (42.0) 1.93×10 <sup>4</sup> (58.0)	11.2	11.2	
20	Коприва (лист)	3.1	0.2	9.0	0.5	0.2	7.4	1.5	21.9	24.9	28.6	50.5	24.9	1.62×10 <sup>6</sup> (3.9) 2.46×10 <sup>5</sup> (6.6) 0.76×10 <sup>4</sup> (89.5)	14.0	7.5	
21	Коприва (корен)	1.0	0.2	2.3	0.5	1.5	2.9	44.0	52.4	4.3	5.4	57.8	20.4	1.95×10 <sup>6</sup> (8.1) 1.55×10 <sup>4</sup> (91.9)	13.7	1.5	
22	Лайка (цвят)	1.4	0.1	2.8	1.3	0.3	5.8	1.3	13.0	48.1	49.9	62.9	65.6	4.95×10 <sup>4</sup>	4.5	2.6	
23	Липа (цвят)	1.2	+	4.8	0.8	0.1	2.8	0.5	10.2	33.6	45.9	56.1	29.7	1.23×10 <sup>6</sup> (67.5) 4.72×10 <sup>4</sup> (32.5)	2.2	2.7	
24	Машерка (н. ч.)	1.4	0.2	7.4	3.0	1.6	5.1	6.2	24.9	24.2	32.0	56.9	62.3	1.01×10 <sup>6</sup> (7.1) 1.58×10 <sup>4</sup> (92.9)	15.7	9.0	
25	Мурсалски чай (н. ч.)	2.3	0.1	11.6	7.1	0.3	7.4	1.4	30.2	40.4	40.3	70.5	72.0	5.32×10 <sup>4</sup>	4.2	3.3	
26	Риган - бял (н. ч.)	1.0	0.1	4.3	0.9	1.3	4.0	2.6	14.2	21.1	32.8	47.0	66.9	1.81×10 <sup>4</sup> (94.2) 0.72×10 <sup>3</sup> (5.8)	18.3	20.2	
27	Риган – червен (н. ч.)	0.7	0.1	6.0	1.3	2.0	5.3	5.0	20.4	28.6	36.2	56.6	68.7	1.76×10 <sup>4</sup>	11.6	9.2	
28	Салвия (н. ч.)	1.7	0.1	5.7	1.1	3.4	6.1	1.9	20.0	31.6	36.0	56.0	70.5	1.62×10 <sup>4</sup>	12.6	7.9	
29	Тученица (н. ч.)	1.1	+	11.0	1.0	0.5	10.8	10.1	34.5	40.1	43.2	77.7	63.4	5.30×10 <sup>4</sup> (49.0) 1.69×10 <sup>4</sup> (51.0)	3.3	0.8	
<i>Лечебни горски плодове</i> <b>(Група В)</b>		Монозахариден състав (като алдитол ацетати)															
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	H3(б)	GalA	AУС(в)	O3(г)	СМ(д)	M <sub>w</sub> [Da] (%)	Белтък	ОПФ(е)	
		[w/w% СВ] (ж)															
30	Арония (плод)	0.3	н.н	3.4	1.0	0.1	5.5	0.6	10.9	24.6	26.8	37.7	н.а.	7.05×10 <sup>4</sup>	28.5	31.1	
31	Арония (лист)	9.1	н.н.	2.9	0.6	0.2	9.4	1.0	23.2	26.9	33.2	56.4	н.а.	1.06×10 <sup>6</sup> (71.7) 1.26×10 <sup>4</sup> (28.3)	2.0	5.2	
32	Кисел трън (плод)	0.9	0.2	10.3	1.3	19.2	5.8	1.9	39.6	21.3	30.3	69.9	н.а.	3.72×10 <sup>5</sup> (47.4) 8.01×10 <sup>4</sup> (52.6)	11.5	9.9	
33	Къпина (плод)	0.6	0.2	9.7	1.1	0.5	6.4	1.9	20.4	48.7	55.3	75.7	н.а.	2.86×10 <sup>5</sup>	3.6	4.7	

34	Къпина (лист)	1.6	+	2.6	1.1	1.5	4.1	5.6	16.5	7.0	14.2	30.7	39.2	6.67×10 <sup>4</sup> (11.8) 0.96×10 <sup>4</sup> (88.2)	14.7	37.0
35	Малина (плод)	1.0	0.2	8.9	2.6	0.8	8.0	2.4	23.9	49.3	50.4	74.3	87.6	4.97×10 <sup>5</sup> (27.8) 5.29×10 <sup>4</sup> (72.2)	5.6	2.2
36	Малина (лист)	1.0	+	1.8	1.3	1.1	3.8	5.7	14.7	7.1	12.9	27.6	н.а.	5.41×10 <sup>4</sup> (7.4) 3.65×10 <sup>3</sup> (92.6)	13.9	33.5
37	Офика (плод)	0.5	н.н.	6.6	0.9	0.1	8.1	1.2	17.4	32.0	39.0	56.4	н.а.	5.48×10 <sup>4</sup>	15.5	15.6
38	Черен бъз (плод)	0.4	0.6	5.4	1.5	0.6	3.9	2.8	15.2	33.5	40.9	56.1	72.6	1.29×10 <sup>6</sup> (11.7) 5.11×10 <sup>5</sup> (19.1) 9.8×10 <sup>4</sup> (51.9) 6.46×10 <sup>2</sup> (17.3)	17.1	2.1
39	Черен бъз (цвет)	1.3	0.1	7.6	1.2	0.5	5.9	1.6	18.2	32.4	44.1	62.3	73.3	1.27×10 <sup>4</sup>	6.3	3.3
40	Шипка (люспа)	0.7	+	7.1	0.2	0.1	4.9	7.2	20.2	31.4	43.9	64.1	68.1	4.29×10 <sup>4</sup>	3.0	19.6
41	Ягода (плод)	1.0	0.2	7.7	1.6	0.6	9.1	2.0	22.2	45.0	54.1	76.3	н.а.	4.96×10 <sup>5</sup> (67.5) 3.68×10 <sup>4</sup> (32.5)	3.3	1.9
42	Ягода (лист)	2.0	н.н.	2.5	1.0	0.8	5.4	5.9	17.6	11.8	22.7	40.3	27.4	1.51×10 <sup>6</sup> (12.3) 5.57×10 <sup>4</sup> (4.6) 5.21×10 <sup>3</sup> (67.4) 6.99×10 <sup>2</sup> (15.8)	11.6	30.1

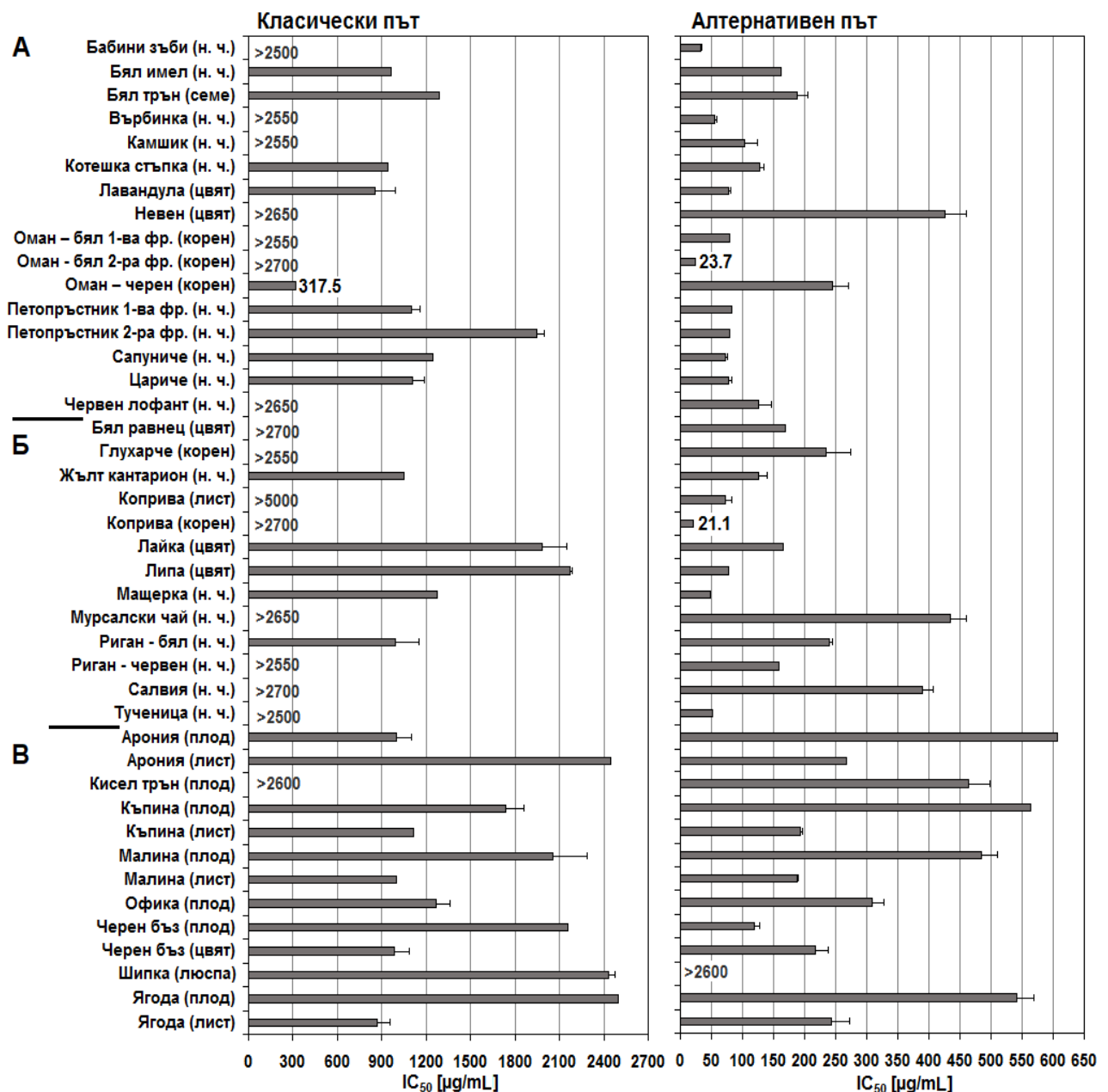
(а)надземна част (**н. ч.**); не е анализирано (**н.а.**); не е намерено (**н.н.**); (б)неутрални захари (**НЗ**) – сума от неутралните монозахариди; (в)анхидроуроново съдържание (**АУС**) – сходно с ПУС; (г)общи захари (**ОЗ**) – сума от НЗ и АУС; (д)степен на метоксилиране (**СМ**), moles метоксилни групи за 100 moles GalA, mol%; (е)общи полифеноли (**ОПФ**); (ж)За GalA, АУС, СМ, Белтък и ОПФ са определени и стандартните отклонения, но стойностите не са включени, тъй като допълнително ще натоварят таблицата; Резултатите за монозахаридния състав са от 2 паралелно дериватизирани повторения; (з)Следи (+).

При алкохолното утаяване в процеса на получаването на ПЗСК-и от бял оман и петопръстник бяха обособени две разделени утайки, които се различават и по монозахариден състав. За разлика от корените на копривата в листата са застъпени предимно киселите ПЗ и съдържанието на Glc в комплекса от листата е много по-ниско. По съдържанието на Хуl може да се съди за наличието на различни хемицелулози в получените комплекси, като тя влиза в състава и на т. нар. ксилогалактуронан в пектина (Schols & Voragen, 2002). Fuc беше намерена в много ниски количества, като тя обикновено присъства в страничните вериги на РГ-II и други ПЗ. АУС на пробите варира между 0.7% за ПЗСК от бял трън (семе) и 55.3% за този от къпина (плод), а съдържанието на неутрални захари от 9.4% за пробата от бял трън (семе) и 52.4% за тази от коприва (корен) (**табл. 2**). АУС и GalA са най-много в плодовете и цветовете и най-малко в корените на растенията. Обратно, неутралните захари са най-много в корените. Тези закономерности са свързани с различната физиологична роля на пектините и неутралните ПЗ в растенията. Медианите на АУС в трите групи са: 27.3% (**А**), 35.9% (**Б**) и 39% (**В**), а за неутралните захари: 21.6% (**А**), 21.9% (**Б**) и 18.2% (**В**). Тези данни показват, че в групите **Б** и **В** над 50% от комплексите са с по-високо от 35% АУС, т.е. те са богати на пектини. В 29 от 42-те проби съдържанието на общи захари е над 50% (медиана= **56.1%**). Това доказва, че става дума за ПЗ-ни комплекси, а не за класически водни билкови екстракти, в които ПЗ-те са съпътстващи съединения. От разликата АУС - GalA се вижда, че в повечето комплекси АУС е представено

предимно от GalA. При липата, листата на горските плодове, бял риган и др. присъства и GlcA в малко по-големи количества, което не се открива в литературата. За липовия ПЗСК беше открито с 3,5-диметилфеноловия метод, че АУС е представено от 33.6% GalA и 14.3% GlcA. От наличните данни за СМ прави впечатление, че пектините в повечето от изследваните проби са високометоксилирани (т.е. със  $СМ \geq 50\%$ ), като това е свързано с начина на екстрахиране на комплексите. Пектините от липа и двата от коприва се характеризират с ниска СМ. Молекулната маса на повечето ПЗ-ни фракции е под 100 kDa, като почти всички комплекси притежават молекулна полидисперсност по отношение на ПЗ-те компоненти. Допълнително бяха определени белтъчините и полифенолите в комплексите с цел по-задълбочено тълкуване на данните от последващите биологични анализи.

### 3.2. Имуномодулираща активност на билковите ПЗСК-и

#### 3.2.1. *In vitro* комплемент-фиксираща активност



**Фиг. 1** Концентрации на билковите ПЗСК-и, водещи до 50% инхибиране на комплементната хемолiza ( $IC_{50} \pm SEM$ ) на прицелни сенсibiliзирани овчи еритроцити (класически път) и прицелни заешки еритроцити (алтернативен път).

Комплемент-фиксиращият тест беше избран за първичен скрининг в търсене на активни

ПЗСК-и. Комплемент-фиксиращата активност на ПЗСК-и беше по-висока по АП, отколкото по КП (**фиг. 1**). Колкото по-ниска е  $IC_{50}$  стойността на даден комплекс, толкова по-висока активност той проявява. Комплексите от група **A** и **B** показаха по-висока активност в сравнение с тези получени от широко използваните билки (**B**). С най-висока активност по КП се откри пробата от черен оман с  $IC_{50} = 317.5 \mu\text{g/mL}$ . С изключение на пробите от черен оман, черен бъз (цвят) и бял имел ( $\geq 55\%$  въглехидратно съдържание) всички останали с  $IC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$  съдържат представителни количества полифеноли ( $>10\%$ ) (**табл. 2**). Затова не е изключено полифенолите в тези проби да допринасят за наблюдаваната активност. Влиянието на полифенолите върху антикомплементарната активност в някои от комплексите е разгледано в Глава 2. Четиринадесет от 42-те проби проявиха комплемент-фиксираща активност с  $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$  по АП. В 8 от тези 14 проби АУС (и GalA) заема значителна част (55-82%) от въглехидратното съдържание, което варира от 44.4 до 77.7% в тях (**табл. 2**). Това подсказва, че пектините са въввлечени в наблюдавания ефект. Най-много проби с  $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$  се откриват в група **A**, последвана от група **B**. В групата на горските плодове не се намират проби с такава активност. С най-висока комплемент-фиксираща активност сред всички комплекси се проявиха пробите от коприва (корен) и бял оман 2-ра фр., с  $IC_{50} = 21.1$  и  $23.7 \mu\text{g/mL}$ , съответно. Тези данни показват, че наред с добива е важно и колко ниска е минималната концентрация на пробата за проявление на висока имуномодулираща активност.

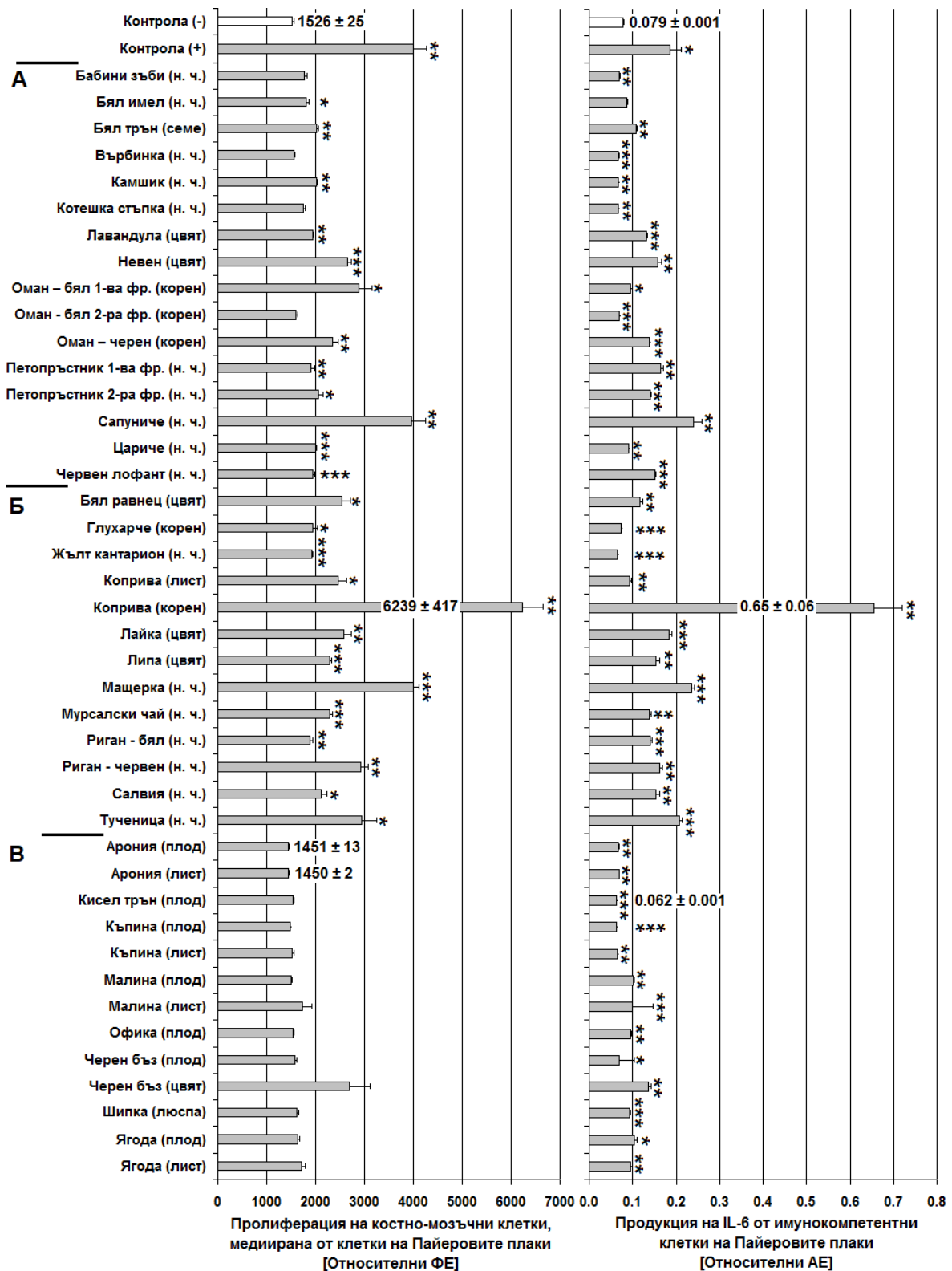
### 3.2.2. *Ex vivo* интестинална имуномодулираща активност

Тестът беше избран за вторичен скрининг на активни комплекси. За разлика от теста с комплемента, при този анализ евентуалното влияние на съпътстващите ЛПЗ в пробите е силно ограничено, тъй като за експериментите са използвани опитни мишки със силно намален отговор към ЛПЗ (СЗН/HeJ, Tlr4<sup>Lps-d</sup>). Най-активната проба (100  $\mu\text{g/mL}$ ) и по двата изследвани ефекта е коприва (корен) с  $6239 \pm 417$  относителни ФЕ за пролиферацията на костно-мозъчните клетки и  $0.65 \pm 0.06$  относителни АЕ за продукцията на IL-6 ( $p < 0.01$ ) (**фиг. 2**). Вижда се, че нейната активност е по-висока от тази на (+) контрола AMOL-1 пектинова фракция от *A. mongholicus* (Kiyohara et al., 2010). ПЗСК от коприва (корен) беше и най-активният по АП (**фиг. 1**). Медианите за цялата извадка от 42 ПЗСК-а бяха 1943 и 0.1, съответно за двата показателя. Най-висока и статистически значима пролиферативна активност върху костно-мозъчните клетки, след ПЗСК от коприва (корен), проявиха пробите от мащерка, сапуниче, тученица, червен риган, бял оман 1-ва фр. и др. Аналогично за IL-6 продукцията, след коприва (корен): сапуниче, мащерка, тученица, лайка и др. Характерна особеност на въглехидратния състав на активните проби е високото съдържание на пектинови ПЗ (GalA, Ara, GalA) и/или глюкани (или инулин за омана) (**табл. 2**). От тях само мащерката и червеният риган се характеризират с представително полифенолно съдържание, но съдейки по ниската активност на богатите на полифеноли ПЗСК-и, едва ли те допринасят съществено за наблюдаваната активност. Най-много активни комплекси се намират в групата на широко използваните билки (**B**), последвана от тази на билките със специфично приложение (**A**) и най-малко при горските плодове (**B**). Богатите на лесно екстрахируеми кисели ПЗ проби от често употребяваните билки като черен бъз (цвят), невен, лайка, коприва (лист) и липа показаха добра активност. Наред с това, те проявиха и относително висока антикомплементарна активност по АП.

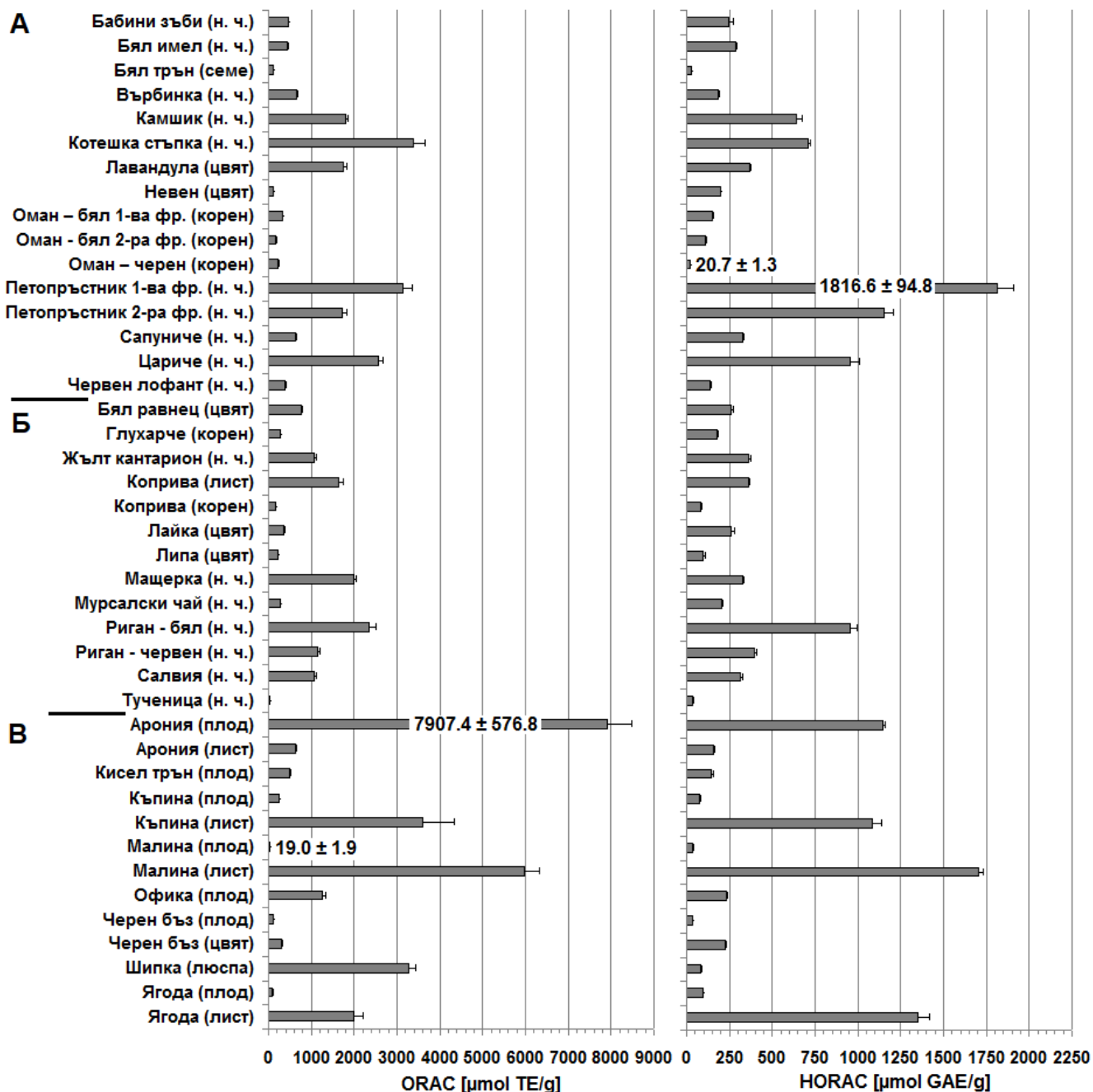
### 3.3. Антиоксидантна активност

Понеже известна част от билковите ПЗСК-и се характеризират с полифенолно съдържание над 10% (33% от пробите в **табл. 2**) беше определен и антиоксидантният потенциал на всички комплекси. Антиоксидантната активност беше определена по два метода ORAC и HORAC (**фиг. 3**). Медианата по ORAC метода беше  $630.4 \mu\text{mol TE/g}$ , а по HORAC -  $237.3 \mu\text{mol GAE/g}$  за цялата извадка. Както и се очакваше ПЗСК-и с по-високо полифенолно съдържание показаха и по-висока антиоксидантна активност, подсказвайки че именно те са били основно отговорни за наблюдавания ефект. От представените като най-активни проби от теста за интестиналната имуномодулация, с известна антиоксидантна активност по двата метода се откриха основно мащерка, червен риган, коприва (лист) и сапуниче. Биологичните ефекти на пектините и

полифенолите в получените комплекси могат да им придадат двуфункционалност чрез имуномодулиращото и антиоксидантното действие.



**Фиг. 2** Интестинална имуномодулираща активност ( $\pm$ SEM). Повишение в продукцията на костно-мозъчни пролиферативни цитокини от клетки на Пайеровите плаки, култивирани в присъствие или отсъствие на билковите ПЗСК-и (100  $\mu$ g/mL) (вляво). Повишение в продукцията на IL-6 от имунокомпетентни клетки на Пайеровите плаки, култивирани в присъствие или отсъствие на ПЗСК-и (вдясно). Звездичките показват статистическата значимост (\* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01; \*\*\* $p$ <0.001) срещу (-) контрола ( $H_2O$ ). Като (+) контрола беше използвана пектинова фракция AMOL-1, съдържаща АГ-II (Kiyohara et al., 2010). Ф(А)Е (флуоресцентни (абсорбционни) единици).



Фиг. 3 Антиоксидантна активност на билковите ПЗСК-и ( $\pm$ SD). TE (тролокс еквиваленти), GAE (галова киселина еквиваленти).

#### 4. Избор на имунологично активни комплекси за последващи изследвания

На основата на получените резултати от двустъпалния имунологичен скрининг беше изготвена извадка от 20 активни проби (номерата им са **почернени** в табл. 2), от общо 42-та изследвани ПЗСК-а. Извадката беше съставена от 50% комплекси от група **A**, 45% от **B** и само 5% от **B**. Медианите за общото въглехидратно съдържание и екстрахируемостта на киселите ПЗ в извадката с активни проби са 53.4% и 61.5%, съответно. Около 75% от комплексите съдържат >50% кисели ПЗ. Получените резултати сочат, че с гореща вода могат да се извлекат повече от половината пектини и то такива с имуномодулираща активност (вж. Глави 2-6). Разбира се, това не омаловажава и влиянието на другите съединения в комплексите (вж. Глава 2). Медианата на АУС е 30.3%, което потвърждава, че значителна част от въглехидратното съдържание се дължи на уронидите. Медианите за СМ и СА са 60% и 11.1%, съответно. Сборът Ara + Gal, отразяващ наличието на имунологично активните арабинани, галактани и най-вече АГ от страничните вериги на РГ-I, както и за Glc, която изгражда едни от най-мощните имуномодулатори - глюканите, бяха сравнени в извадката. От данните за Ara + Gal



може да се каже, че около 55% от комплексите съдържат грубо между 9% и 15% общо от двата монозахарида. Около 60% от активните проби имат съдържание на Glc до 5% (медианата е 4.6%), което показва, че активността в тези комплекси не се дължи на неутралните глюкозани ПЗ. Общите полифеноли са до 5% (медианата е 5.3%) в около 50% от комплексите, което изключва тяхното значение за проявление на наблюдаваните активности в тези проби.

Няколко ПЗСК-а бяха подбрани като перспективни за последващо изолиране и изучаване на ПЗ-те в тях и най-важното определяне на приноса на ПЗ-те в забелязаната интестинална (антикомплементарна) имуномодулираща активност. От активните комплекси бяха избрани коприва (корен и лист), тученица, липа и лавандула. Пробите бяха подбрани по следните важни научно-приложни критерии: активност (коприва-корен, тученица), кисел характер (липа, тученица, лавандула, коприва-лист), добив (тученица, липа), неизследвани видове (коприва-лист, лавандула), широко приложение (коприва, липа, тученица, лавандула). ПЗСК от коприва (корен) беше избран поради най-високата му имуномодулираща активност по двата тествани метода, а този от коприва (лист), преди всичко за сравнителен анализ с ПЗ-те в корените и поради липсата на литературни данни за ПЗ-те в листата. Комплексът от тученица беше избран също като силно активен за допълнителна характеристика на имуномодулиращите му свойства, тъй като неговите ПЗ са с огромен потенциал за разработване на фитопродукти (вж. Глава 3). Липа ПЗСК беше подбран поради наличието на голямо количество кисели ПЗ с необичайно високо съдържание на GlcA и неизследвана имуномодулираща активност. Комплексът от лавандуловия цвят беше избран, тъй като липсват данни за ПЗ-ния състав на растението. Освен това България е най-големият производител на лавандулово масло от 2011 г., което създава предпоставка за оползотворяване на лавандуловите пресовки чрез разработването на нови продукти с имуномодулиращо и антиоксидантно действие. Резултатите за другите активни, дори и по-активни проби в някои случаи като мащерка, бял оман, черен оман, черен бъз (цвят), лайка, невен заслужават също внимание. Те, заедно с други популярни билки с частично изучени ПЗ, бяха включени в изследването, за да може да се сравни активността между изследваните и неизследваните суровини с цел създаване на една справочна информация с широко научно-техническо приложение.

## Глава 2

### **Оценяване влиянието на водно- и етанолно-разтворимите органични съединения, извлечени от подбрани билкови полизахаридни комплекси върху проявяваната от тях комплемент-фиксираща активност**

#### **Резюме**

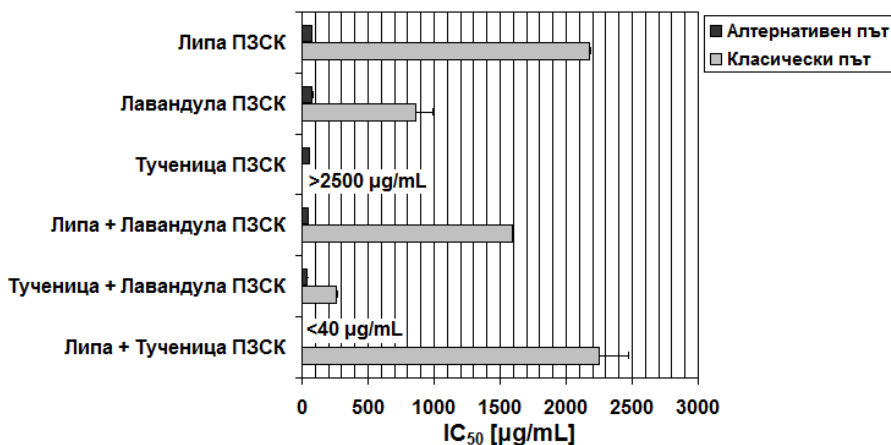
От ПЗСК-и от липа, лавандула и тученица бяха получени водно-алкохолни екстракти, чиито водни концентрати бяха подложени на течна-течна екстракция с петролев етер и *n*-бутанол за селективно извличане на нискомолекулните съединения. В резултат на проведения фитохимичен анализ беше установено, че в билковите ПЗСК-и се съдържат физико-химично свързани към ПЗ-те въглеродороди, мастни киселини, захари, фитостероли, тритерпенови киселини, фенолни киселини, флавоноиди, фенилпропаноиди, аминокиселини и др. Етерните екстракти, богати на мастни киселини, показаха много ниска комплемент-фиксираща активност по КП и бяха неактивни в диапазона 156-2500 µg/mL по АП. Водните екстракти, богати на полифенолни съединения, проявиха по-висока активност по КП ( $IC_{50}$ = 200.7-441.6 µg/mL), отколкото по АП. Най-големите по добив ПЗ-ни фракции ПЗК2, получени след отделянето на водно-алкохолните екстракти показаха по-висока активност по двата пътя от съответните изходни ПЗСК-и. Трите ПЗК2 бяха по-активни по АП ( $IC_{50}$ <60 µg/mL), както и самите изходни ПЗСК-и ( $IC_{50}$ <77 µg/mL). Бутанолните екстракти от липа и тученица проявиха по-висока активност по АП ( $IC_{50}$ = 471.7 и 115.9 µg/mL), а този от лавандула, богат на полифеноли, по КП ( $IC_{50}$ = 201.1 µg/mL). На базата на фитохимичните анализи и комбинаторния ефект от смесването на изходните ПЗСК-и и отделните екстракти беше предложено, че полифенолите допринасят положително, а мастните киселини отрицателно за

проявлението на комплемент-фиксираща активност от ПЗСК-и по КП. Високата активност на ПЗСК-и по АП беше свързана основно с ПЗ-те.

Целта на настоящата глава е да се изследва влиянието на етанолно- и водно-разтворимите органични съединения в избрани билкови ПЗСК-и върху комбинаторната комплемент-фиксираща активност на отделните комплекси и смеси от тях.

### 3. Резултати и дискусия

#### 3.1. Комплемент-фиксираща активност на смеси от ПЗСК-и



**Фиг. 1** Концентрации на получените смеси (1:1) от избрани ПЗСК-и, водещи до 50% инхибиране на комплементната хемолиза ( $IC_{50} \pm SEM$ ) по класическия път и алтернативния път.

обясни с високата активност и на самите изходни комплекси – липа ПЗСК (77.0 µg/mL), лавандула ПЗСК (77.2 µg/mL) и тученица ПЗСК (51.1 µg/mL), което води и до известен синергичен ефект в смесите. С най-висока активност по КП се характеризираше лавандула ПЗСК ( $IC_{50}= 856.8 \mu\text{g/mL}$ ), чието съчетаване с тученица ПЗСК доведе до синергично действие ( $IC_{50}= 256.3 \mu\text{g/mL}$ ). При тази комбинация се наблюдаваше най-висока активност и по двата пътя, в сравнение с изходните комплекси и останалите две комбинации. В проявлението на наблюдаваните синергични ефекти в смесите участват както високомолекулните съединения или ПЗ-те, така и различните нискомолекулни съединения.

#### 3.2. Течно-течна екстракция на алкохолно- и водно-разтворими молекули от ПЗСК-и

Водно-екстрахируем полизахарид-съдържащ комплекс (ВЕПЗСК)  
**ЛИПА (ЦВЯТ)**  
 (1000 mg/100 mL д. вода)

<sup>1</sup> ПЗК2	<sup>3</sup> ПЗК3	<sup>4</sup> ПЗК4	<sup>4</sup> ПЗК5	<sup>5</sup> Етеров екстракт	<i>n</i> -Бутанолов екстракт	<sup>6</sup> Воден остатък
47.1%	15.6%	13.6%	10.6%	1.2%	0.6%	0.9%

Добив: 89.6%

ВЕПЗСК  
**ТУЧЕНИЦА (НАДЗЕМНА ЧАСТ)**  
 (1000 mg/100 mL д. вода)

<sup>1</sup> ПЗК2	<sup>3</sup> ПЗК3	<sup>4</sup> ПЗК4	<sup>5</sup> Етеров екстракт	<i>n</i> -Бутанолов екстракт	<sup>6</sup> Воден остатък
72.8%	18.2%	1.1%	0.6%	0.4%	1.0%

Добив: 94.1%

ВЕПЗСК  
**ЛАВАНДУЛА (ЦВЯТ)**  
 (500 mg/50 mL д. вода)

<sup>2</sup> ПЗК2	<sup>5</sup> Етеров екстракт	<i>n</i> -Бутанолов екстракт	<sup>6</sup> Воден остатък	<sup>7</sup> ПЗК3
76.5%	1.6%	3.7%	6.2%	8.8%

Добив: 96.8%

**Фиг. 2** Фракциониране на избрани ПЗСК-и при течно-течна екстракция на алкохолно-разтворимите молекули от тях. ПЗК (полизахариден комплекс).

Разяснения:

<sup>1</sup>Двукратно утаени ВЕПЗСК-и в 70% (v/v) етанол (с цел извличане на етанолно-разтворими молекули).

<sup>2</sup>Петкратно утаен ВЕПЗСК в 70% етанол (с цел както в т. 1).

<sup>3</sup>Получени от водния остатък (изпаряване на етанола), след утаяване с двукратен обем 95% етанол (в 63% етанол).

<sup>4</sup>Коагулирани от емулсионните слоеве в делителните фунии, след екстракцията с органичните разтворители от водно-алкохолните екстракти на ВЕПЗСК-и.

<sup>5</sup>Петролев етер.

<sup>6</sup>Воден остатък от водно-алкохолните екстракти на ВЕПЗСК, след екстракцията с органичните разтворители и пречистване на колона Amberlite® XAD7HP.

<sup>7</sup>Получен от промивните води при пречистването на водния остатък на колона с Amberlite® XAD7HP.

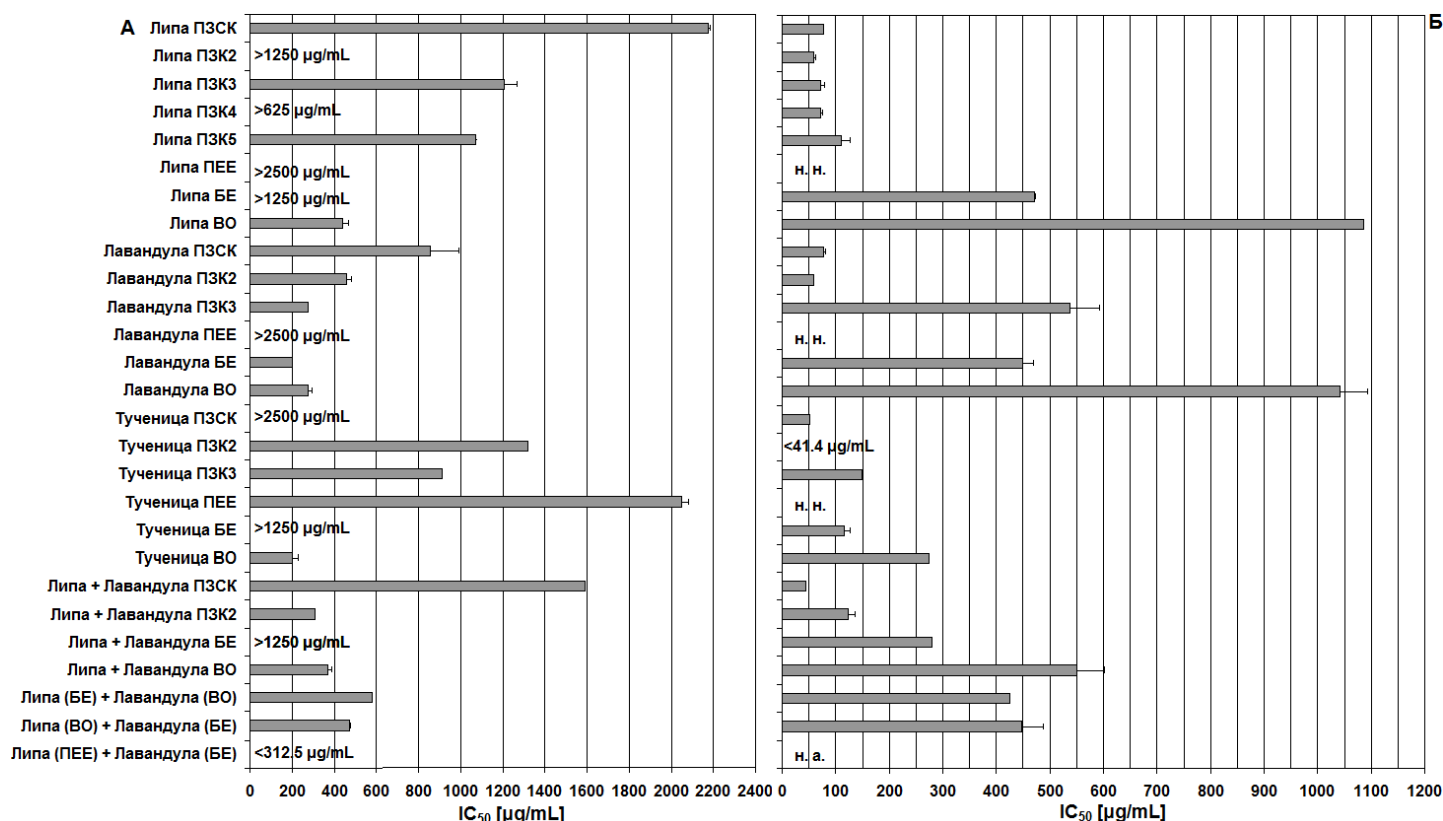
За частично оценяване влиянието на етанолно- и водно-разтворимите органични съединения върху проявлението на комплемент-фиксираща активност от комплексите беше проведена следната обработка (**фиг. 2**): трите ПЗСК-и бяха разтворени във вода и ПЗ-те бяха утаени с трикратен обем 95% етанол няколко пъти. Водно-алкохолният извлек беше подложен на вакуумконцентриране, а с получения воден концентрат беше проведена течно-течна екстракция последователно с петролев етер и *n*-бутанол. От тази обработка бяха получени три екстракта: етерен, бутанолов и воден (наречен воден остатък). По този начин алкохолно- и водно-разтворимите нискомолекулни съединения бяха частично разделени в трите екстракта. Водният остатък беше пречистен на колона запълнена с Amberlite® XAD7HP за извличане на полифенолните съединения. В хода на получаване на екстрактите беше използван етанол за отстраняване на остатъчни количества от ПЗ-те в тях.

### 3.3. Влияние на водно- и алкохолно-разтворимите съединения върху комплемент-фиксиращата активност на изходните ПЗСК-и

IC<sub>50</sub> стойностите по КП на ПЗК-и от трите билки са по-ниски след неколнократното утаяване с етанол в сравнение с тези на ПЗСК-и (**фиг. 3**). Следователно с намаляване на нискомолекулните съединения и увеличаване на високомолекулните (т.е. ПЗ-те) се повишава активността. От данните по АП се вижда, че активността на най-големите по добив (47-77% от изходните комплекси) ПЗК2 е малко по-висока след частичното пречистване. С изключение на лавандула и тученица ПЗК3, IC<sub>50</sub> стойностите на останалите ПЗК-и от трите билки бяха по-ниски от тези на екстрактите с нискомолекулните съединения. Следователно ПЗ-те до голяма степен са отговорни за проявлението на активността по АП. Тученица ПЗК4 не беше включена в изследването поради ниския ѝ добив. Участието на пречистените ПЗ в наблюдаваната комплемент-фиксираща активност на комплексите се разглежда в Глави 4 и 5. IC<sub>50</sub> стойностите на трите етерни екстракта по КП бяха над 2000 µg/mL, а по АП те не проявиха антикомплементарна активност в диапазона 2500-156 µg/mL. Това показва, че някои съединения в етерните екстракти имат много ниска активност и/или противоположно действие на това на ПЗ-те върху СК. При бутанолните екстракти само този от лавандула (IC<sub>50</sub>= 201.1 µg/mL) показва добра активност по КП, докато другите два липа (IC<sub>50</sub>= 471.7 µg/mL) и тученица (IC<sub>50</sub>= 115.9 µg/mL) БЕ, бяха по-активни по АП. Активността на водните остатъци беше по-висока по КП, отколкото по АП. Имайки предвид, че те би трябвало да са богати на полифеноли може да се каже, че този ефект се дължи именно на тях. С най-висока антикомплементарна активност по КП се откриха тученица ВО (IC<sub>50</sub>= 200.7 µg/mL) и лавандула БЕ.

С цел опит за проучване на сложното синергично действие в сместа липа + лавандула ПЗСК, бяха изследвани различни логични комбинации между получените основни по добив ПЗК2 фракции и отделно между екстрактите от двата ПЗСК-а. Тази комбинация беше избрана поради близките етнофармакологични приложения на липата и лавандулата, и оттам възможността за приготвяне на смесени билкови чайове от тях. От данните на **фиг. 3** се вижда, че при комбинирането на липа и лавандула ПЗК2 се наблюдава синергично действие по КП с IC<sub>50</sub>= 308.8 µg/mL на сместа. Такъв ефект не се наблюдаваше при комбинацията липа + лавандула ПЗСК (**фиг. 1**). Обратно, въпреки високата активност на липа ПЗК2 и лавандула ПЗК2 по АП, тяхното комбиниране не доведе до същата или по-висока активност, както беше наблюдавано с изходните проби. Възможно е част от молекулите, които са били отговорни за това синергично действие на сместа от изходните ПЗСК-и да не присъстват в ПЗК2. При разглеждане на комбинациите на трите екстракта на нискомолекулните съединения по КП се вижда, че при нито една комбинация не се наблюдава синергизъм на действие. При комбинацията липа БЕ + лавандула БЕ се получи IC<sub>50</sub> стойност, която беше няколко пъти по-висока от тази на активната лавандула БЕ. При другите две смеси, в които участваше лавандула БЕ с липа ВО или липа ПЕЕ не се получиха такива големи разлики в активността с двукратното разреждане. Това подсказва за наличие на някакво потискане в случая от страна на липа БЕ, която изначално прояви много ниска активност. Понеже IC<sub>50</sub> стойността на липа ПЕЕ + лавандула БЕ беше в съгласие с разреждането на лавандула БЕ може да се каже, че съединенията в етерния екстракт

не са потиснали действието на компонентите на лавандула БЕ. При комбинацията на лавандула БЕ с липа ВО също не се получиха огромни разлики в активността от разреждането. По АП при комбинирането на двата бутанолни екстракта или двата водни остатъка се наблюдаваше по-висока активност. Това беше установено и при смесването ВО + БЕ помежду им. Следователно в двата вида екстракти се съдържат съединения със сходен начин на действие. Вероятно тези нискомолекулни съединения също допринасят за наблюдавания синергизъм на липа + лавандула ПЗСК по АП (фиг. 1). Комбинацията липа ПЕЕ + лавандула БЕ не беше изследвана по АП, тъй като етерните екстракти не показаха активност, както беше казано по-горе.



**Фиг. 3** Концентрации на получените фракции, водещи до 50% инхибиране на комплементната хемолиза ( $IC_{50} \pm SEM$ ) по **А.** класическия път и **Б.** алтернативния път. **ПЕЕ** (петролев етер екстракт), **БЕ** (бутанолов екстракт), **ВО** (воден остатък), **н. н.** (не е намерено) и **н. а.** (не е анализирано).

### 3.4. Фитохимичен състав на водно- и алкохолно-разтворимите съединения в ПЗСК-и

**Таблица 1.** Фенолни киселини и флавоноиди във водните остатъци от тученица (1), липа (2) и лавандула (3).

Фенолни к-ни [ $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ ]	1	2	3	Флавоноиди [ $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ ]	1	2	3
Хлорогенова	-	-	77.4	Кверцетин	185.8	221.9	804.7
Неохлорогенова	-	-	74.3	Кверцетин-3- $\beta$ -глюкозид	-	-	734.9
Ванилинова	4.7	-	154.2	Мирицетин	-	113.3	445.9
Кафеена	-	-	77.4	Кампферол	52.2	50.2	-
p-Кумарова	-	-	84.8	Нарингин	-	-	977.6
Ферулова	-	-	512.8	Нарингенин	-	36.3	-
Елагова	29.5	153.6	186.6	Катехин	157.4	948.5	385.4
Протокатехова	20.1	273.9	54.0	Епикатехин	-	461.3	497.7
Канелена	21.3	29.2	114.8				
Галова	24.8	77.4	22.5				

Монозахаридният състав на ПЗ-те в комплексите е изследван в Глави 1 и в 3-5. В **табл. 1** са представени резултатите от HPLC-UV анализа за съдържание на фенолни киселини и флавоноиди във водните остатъци от трите билкови ПЗСК-а. Водният остатък от лавандула беше най-богат на откритите фенолни киселини и флавоноиди, последван от остатъка от липата. Независимо от ниските количества на идентифицираните фенолни съединения, имайки предвид начина на получаване на водните остатъци е ясно, че те съдържат значителни количества полифеноли. Получените данни показват преимуществото на флавоноидите пред фенолните киселини във водните остатъци.

От проведения фитохимичен анализ на етерните и бутаноловите екстракти от липа и лавандула ПЗСК-и се вижда, че в изследваните комплекси наред с ПЗ-те се съдържат макар и в доста по-ниски количества голямо разнообразие от нискомолекулни съединения, които повлияват комплемент-фиксиращата активност на комплексите (**табл. 2**). Извличането на физико-химично свързаните нискомолекулни съединения към ПЗ-те е доста трудно, ето защо известна част от детектираните съединения са останали и в получените ПЗК-и. Съгласно използваният тест за изследване на комплемент-фиксиращата активност не може да се разграничи комплементното активиране от инхибирането. Пектините проявяват предимно комплемент-активиращ ефект по двата пътя (Kiyohara et al., 2006; Wang et al., 2016). Обратно, флавоноидите и фенолните киселини са комплементни инхибитори по КП (Papakotsi et al., 2017). При сравнително разглеждане на фитохимичния състав на липа и лавандула БЕ се вижда, че екстрактът от липа съдържа ~10% въглехидороди и почти 4 пъти по-голямо количество мастни к-ни. От комбинацията липа ПЕЕ + лавандула БЕ не беше установено потискащо действие върху активността на бутаноловия екстракт от страна на етерния. Следователно не би следвало въглехидородите, които и без това се възприемат като слабо реакционноспособни да са свързани с потискащия ефект на липа БЕ. Основната разлика в мастнокиселинния състав на липа БЕ и ПЕЕ е, че първата съдържа големи количества маслена к-на, която съставлява 50% от мастните к-ни в пробата. Ето защо беше предположено, че за потискащото действие на липа БЕ са отговорни до някаква степен мастните к-ни и по-специално маслената к-на. Съществува патент, в който чрез частично ацилиране на свободните NH<sub>2</sub> групи в IgM (R-CO-NH-) при физиологични условия с късоверижни ацилни групи като тази от маслената к-на и други алканоидни (алкеноидни) к-ни се постига потискане активирането на комплемента по КП (Shuzi et al., 1981). Фактът, че комбинирането на лавандула БЕ с липа ПЕЕ не доведе до нелогично, драстично понижение на активността, подкрепя хипотезата, че именно маслената к-на е частично свързана с инхибиращото действие на липа БЕ върху лавандула БЕ. От друга страна, лавандула БЕ беше една от двете най-активни проби по КП. Високото съдържание на кафеена к-на и катехол лактат в тази проба подсказва тяхното значение за проявлението на активността. Тези две съединения са свързани с групата на т. нар. фенилпропаноиди, за които е известно, че са активни върху СК по КП и АП (Oh et al., 1996). Високото съдържание на захари в пробата са индикатор за наличието на различни гликозиди в нея, като например флавоноиди (сапонини). Подобно на водните остатъци и активността на лавандула БЕ се свързва предимно с полифенолите. Следователно активността на лавандула БЕ е по-висока от тази на липа и тученица БЕ по КП, поради факта, че е по-богата на полифеноли.

Откритият синергизъм в антикомплементарното действие по АП на липа + лавандула, липа + тученица или тученица + лавандула ПЗСК се дължи на сложно преплитане от активностите на съдържащите се високомолекулни и нискомолекулни съединения в смесите. Високата постигната комбинаторна антикомплементарна активност показва перспективното приложение на смесените ПЗСК-и за модулиране на СК и подсказва за изучаването на комбинаторната имуномодулираща активност на смесени екстракти от трите билки. В Глава 3 е проучен по-подробно имуномодулиращият потенциал на билковите ПЗСК-и от липа, тученица и лавандула с цел разширяване на кръгозора на тяхното евентуално използване в разработването на хранителни и фитотерапевтични продукти.

**Таблица 2.** GC-MS анализ за качествено и количествено\* определяне (w/w%, m/z 73) състава на екстракти, получени с петролев етер (ПЕЕ) и *n*-бутанол (БЕ) от липовия и лавандуловия ПЗСК-и.

№	RT (min)	Съединение	ПЕЕ Липа	ПЕЕ Лавандула	БЕ Липа	БЕ Лавандула
1	6.51	Млечна киселина	1.1	0.9	4.9	7.3
2	8.48	Аминокиселина**	0.4	0.4	-	-
3	9.16	Маслена киселина	0.7	0.4	28.4	1.3
4	11.30	Карбамид	0.1	0.1	-	-
5	12.01	Фосфорна киселина	0.1	0.1	0.8	1.0
6	12.08	Глицерол	0.2	0.4	1.7	0.1
7	14.44	Пеларгонова киселина (C9:0)	0.1	<0.1	-	-
8	14.67	Аминокиселина**	<0.1	0.1	1.0	0.1
9	18.08	Аминокиселина**	<0.1	0.1	-	1.0
10	18.38	5-оксо-L-пролин	-	-	-	0.8
11	18.81	2,6-дитерт-бутилфенол	-	0.1	-	-
12	20.00	MS	2.6	1.4	-	-
13	21.31	Монозахарид (C5)	-	-	-	0.6
14	21.57	Лауринова киселина (C12:0)	1.1	0.4	0.8	-
15	22.68	<i>n</i> -Хептадекан	0.2	-	-	-
16	23.46	Монозахарид (C5)	-	-	-	13.1
17	24.05	Монозахарид (C6)	-	-	1.1	2.3
18	24.75	Монозахарид (C6)	-	-	1.0	-
19	24.85	<i>n</i> -Октадекан	0.6	-	-	-
20	24.92	Монозахарид (C6)	-	-	0.7	-
21	24.95	<i>n</i> -Фитан (C20)	0.1	0.2	-	-
22	25.29	Миристолеинова киселина (C14:1)	-	0.1	-	-
23	25.39	Монозахарид (C6)	-	-	-	1.9
24	25.81	Миристинова киселина (C14:0)	3.4	2.9	1.0	-
25	26.57	Монозахарид (C6)	-	-	-	0.6
26	26.92	<i>n</i> -Нонадекан	1.0	0.2	-	-
27	27.21	Метил мирилат (C14:0)	-	0.2	-	-
28	27.40	Метил палмитолеат (C16:1)	-	0.1	-	-
29	27.79	Пентадеканова киселина (C15:0)	-	0.9	-	-
30	28.89	<i>n</i> -Ейкозан (C20)	1.0	0.3	-	-
31	29.19	Палмитолеинова (C16:1)	2.6	1.0	0.5	-
32	29.28	Хексадеценива (изомер) (C16:1)	3.3	-	1.0	-
33	29.72	Палмитинова киселина (C16:0)	15.1	20.7	6.6	1.5
34	29.91	Катехоллактат	-	-	-	17.8
35	30.72	Метил олеат (C18:1)	-	0.3	-	-
36	30.81	Метил олеат (C18:1) (изомер)	-	0.1	-	-
37	30.97	Метил палмитат (C16:0)	-	0.4	-	-
38	31.37	Кафеена киселина	-	-	-	12.5
39	31.47	Маргаринова киселина (C17:0)	-	0.9	-	-
40	32.64	<i>n</i> -Докозан (C22)	7.1	0.3	-	-
41	32.67	Октадекадиенова киселина (C18:2)	-	1.2	-	-
42	32.80	Олеинова киселина (C18:1)	6.2	2.1	1.6	0.5
43	33.30	Стеаринова киселина (C18:0)	7.5	27.2	2.8	2.5
44	34.32	<i>n</i> -Трикозан (C23)	1.3	-	2.3	-

45	35.77	2,3-дихидрокси пропил олеат (глицерил моноолеат)	-	0.5	-	-
46	35.98	<i>n</i> -Тетракозан	1.1	-	0.6	-
47	36.10	Олеамид	1.7	-	-	-
48	36.54	Ейкозанова киселина (C20:0)	0.8	1.0	0.9	0.3
49	37.58	<i>n</i> -Пентакозан	2.0	0.5	4.2	-
50	38.41	1-Хексакозен	-	0.6	-	-
51	38.83	2,3-дихидрокси пропил палмитат	-	7.7	-	0.5
52	39.05	<i>n</i> -Хексакозан	-	-	0.5	-
53	39.37	Дизахарид (C12)	-	-	1.4	0.4
54	39.62	Бехенова киселина (C22:0)	1.6	0.4	2.2	-
55	40.57	<i>n</i> -Хептакозан	1.4	0.5	2.3	-
56	41.04	Дизахарид (C12)	-	-	-	0.9
57	41.28	2,3-дихидрокси пропил олеат	2.4	-	-	-
58	41.61	2,3-дихидрокси пропил стеарат	-	6.6	-	0.8
59	42.12	Дизахарид (C12)	-	-	-	1.0
60	42.23	MS	16.6	9.2	3.0	-
61	42.47	Лигноцеровна киселина (C24:0)	2.3	-	3.7	-
62	42.87	MS	1.0	-	0.6	-
63	43.19	Дизахарид (C12)	-	-	-	0.7
64	43.92	MS	1.0	-	0.5	-
65	44.48	MS	-	-	-	1.7
66	45.11	Церотинова киселина (C26:0)	1.0	-	2.4	-
67	45.41	MS	1.3	-	0.6	-
68	46.44	MS	1.3	-	0.6	-
69	47.67	MS	-	-	-	1.7
70	47.68	MS	0.9	-	1.5	-
71	48.27	MS	-	-	-	0.5
72	49.12	$\beta$ -Ситостерол	1.0	-	0.5	-
73	50.43	Розмаринова киселина	-	-	-	1.6
74	50.98	MS	-	-	1.0	-
75	51.14	$\beta$ -Амирин ацетат	-	-	<0.1	-
76	53.33	Олеанолова киселина	-	1.1	-	0.3
77	54.18	MS	-	0.7	-	-
78	54.57	Урсолова киселина	-	2.8	-	1.0
79	55.62	MS	-	-	+	-
80	59.32	MS	1.5	-	-	-

\*процентното съдържание на компонентите, определено чрез GC/MS без стандартни вещества може да служи само за приблизителна оценка на количествения състав; \*\*поради ниската концентрация мас-спектрите не са много отчетливи и еднозначна идентификация не може да се направи.

### Глава 3

**Киселите полизахаридни комплекси от тученица, сребролистна липа и обикновена лавандула стимулират имунокомпетентните клетки от мишите чревни Пайерови плаки чрез механизми на вродения и придобития имунитет\***

#### Резюме

Три ПЗК-а бяха изолирани с кипяща вода и утаяване с етанол от надземната част на тученица (*P. oleracea* L.), цветовете на обикновена лавандула (*L. angustifolia* Miller) и сребролистна липа

\*Отпечатано в списание **International Journal of Biological Macromolecules**, 105, 2017, 730-740.

(*T. tomentosa* Moench). Химичният състав и имуномодулиращите ефекти на получените ПЗК-и бяха охарактеризирани. Анализите по химичния състав показаха, че трите проби съдържат основно пектинови ПЗ. Те проявиха *ex vivo* интестинална имуномодулираща активност чрез клетки от чревните ПП на опитни мишки при 100 µg/mL. В същото време, ПЗК-и стимулираха *ex vivo* човешки кръвни Т-клетъчни субпопулации (CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> клетки), фагоцитарни левкоцити (CD14<sup>+</sup> и CD64<sup>+</sup> клетки) и индуцираха продукцията на IL-6 от човешки бели кръвни клетки, и имунни клетки от ПП. Билковите ПЗК-и стимулираха *ex vivo* продукцията на РФК в човешка кръв и показаха неспецифична *in vitro* антипролиферативна активност срещу нормални и A549, HeLa и LS180 туморни клетъчни линии. Това е първото научно съобщение представящо имуномодулиращите свойства на липовите пектини, както и химичната и биологичната характеристика на лавандуловите ПЗ. Изследването показва, че сходно на тученицата, лавандулата и сребролистната липа съдържат имуномодулиращи ПЗ, които могат да намерят приложение във фитотерапията и храненето за подобряване състояния като потиснатата имунна система.

Целта на настоящата глава е да се изолират ПЗК-и от *L. angustifolia* и *T. tomentosa*, и да се охарактеризира техният химичен състав и имуномодулираща активност, както и да се сравнят получените комплекси по състав и активност с вече изследвания БА ПЗК от тученица (*P. oleracea*).

### 3. Резултати и дискусия

#### 3.1. Изолране и химическо охарактеризиране на трите билкови ПЗК-а

В тази глава трите ПЗК-а са наречени ПЗК-и, тъй като те съдържат над 50% общи захари. Данните по химичната характеристика на трите билкови ПЗК-а са вече представени в Глава 1. ПЗК-и от лавандула и тученица съдържат метоксилирани и ацетилирани пектинови ПЗ с преимуществени ХГ-ви фрагменти, последвани от АГ-ви структури най-вероятно свързани към РГ-I фрагментите. Липовият ПЗК съдържа високомолекулни пектини със значителна СА и ниска СМ, и с високо съдържание на РГ-I и GlcA. От проведения FT-IR анализ на липа и лавандула ПЗК-и, след отстраняване на алкохолно-разтворимите молекули в тях, беше потвърдено преимуществото на РГ-I областта в първия комплекс и ХГ-я регион във втората проба (не е показано).

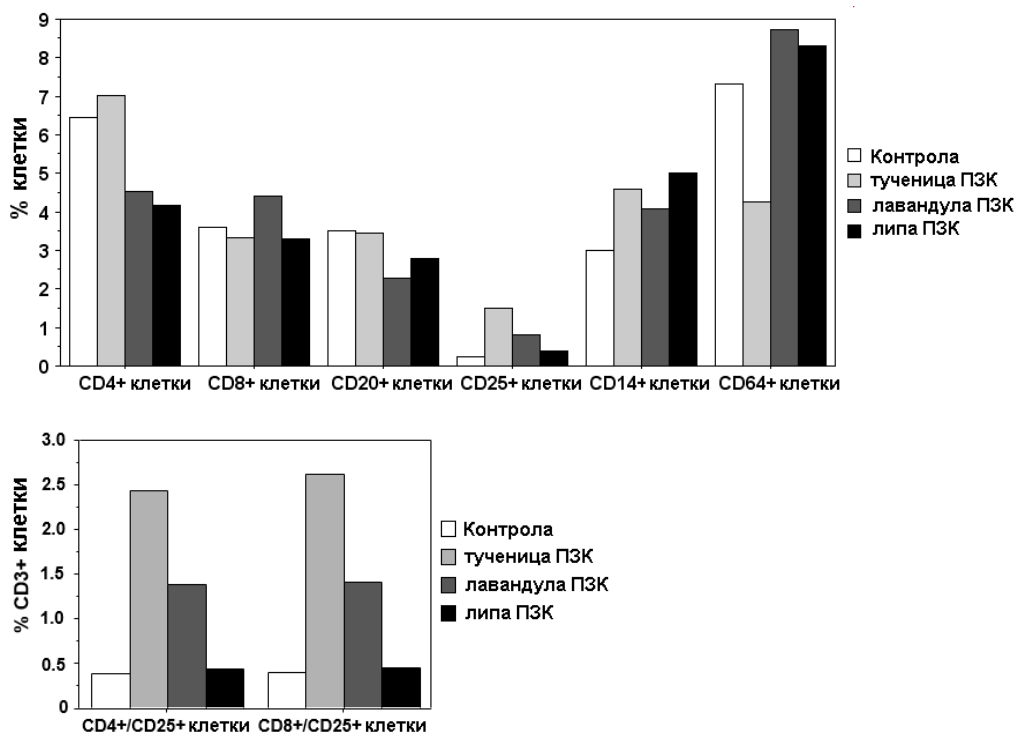
#### 3.2. Имуномодулиращи ефекти

От трите ПЗК-и само ПЗ-те на тученицата бяха изследвани за проявление на *in vitro* и *in vivo* имуномодулираща активност (Li et al., 2014).

##### 3.2.1. Ефект върху човешки бели кръвни клетки

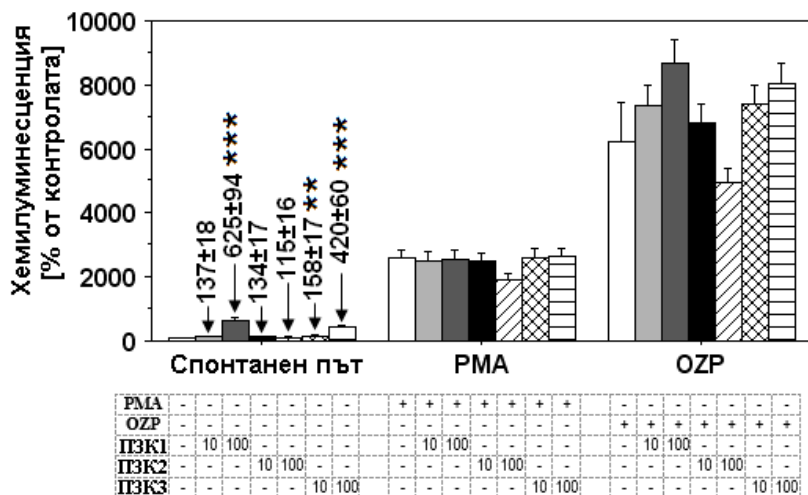
Ефектът на трите ПЗК-и върху различни човешки бели кръвни клетки беше изследван при концентрация от 100 µg/mL чрез флоуцитометричен имунофенотипиращ анализ (фиг. 1). ПЗК от тученица стимулира CD4<sup>+</sup> клетките, докато този от лавандула CD8<sup>+</sup> клетките. Трите проби не проявиха стимулираща активност върху CD20<sup>+</sup> клетките, представлящи В-клетъчната популация. Те активираха до различна степен CD25<sup>+</sup> клетките, които се отнасят както към В-клетките, така и към Т-клетките. Липовият и лавандуловият ПЗК-и дори проявиха инхибираща активност върху CD20<sup>+</sup> В-клетките, което може да се дължи частично и на съдържащите се невъглехидратни компоненти. ПЗК-и от тученица и лавандула показаха стимулиращ ефект върху CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> Т-клетките, а стимулиращият ефект на липовия ПЗК беше слаб. CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> Т-клетките са отговорни за регулирането на имунния отговор при автоимунни и туморни заболявания, и за поддържане на имунната хомеостаза. Билковите комплекси успяха да активират и фагоцитите, като по този начин проявиха по-широка имуностимулираща активност. Трите ПЗК-и показаха активност върху CD14<sup>+</sup> клетките (моноцитите). Липовият и лавандуловият ПЗК-и проявиха активност и върху CD64<sup>+</sup> клетките, представлящи предимно макрофагите. Наблюдаваният ефект върху CD14<sup>+</sup> клетките от ПЗК на тученица не се повтори и върху CD64<sup>+</sup> популацията, което трудно може да бъде обяснено. Трите проби повишиха и продукцията на IL-6 от белите кръвни клетки, което е в съответствие със стимулирането на моноцитите и Т-клетките.





**Фиг. 1** Флоуцитометричен анализ за имунофенотипиране на човешки бели кръвни клетки, третирани с тученица, лавандула или липа ПЗК-и (100 µg/mL).

### 3.2.2. *Ex vivo* ефект върху продукцията на РФК в човешка кръв



**Фиг. 2** Ефект на ПЗК-и от тученица (ПЗК1), лавандула (ПЗК2) и липа (ПЗК3) върху производството на РФК в нестимулирана (спонтанен път), PMA и OZP активирана човешка кръв. 10 (10 µg/mL) и 100 (100 µg/mL). Звездичките показват статистическата разлика (\*\*p<0.01 и \*\*\*p<0.001) срещу контролата (само кръв). (±SEM)

Трите ПЗК-а стимулираха в различна степен оксидативният взрив в човешка кръв при 10 и 100 µg/mL, което се изразяваше в повишението на спонтанния ХЛ-ен отговор. Последният се използва като мярка за продукцията на РФК (фиг. 2). Стимулирането на продукцията на РФК от фагоцитите в кръвта от трите ПЗК-и беше в съгласие с повишените нива на CD14<sup>+</sup> и CD64<sup>+</sup> клетките. Тук под продукцията на РФК в човешка кръв трябва да се разбира основно активността на неутрофилите в кръвта, като последната не бива да се възприема като инертна среда. Неутрофилите представляват между 50-70% от всички левкоцити в кръвта и те се приемат за основен

причинител на общата луминолна ХЛ (Lojek et al., 2014). Най-висока активност при 100 µg/mL се наблюдаваше за ПЗК от тученица, последван от този на липата. ПЗК от тученица се характеризира с по-високо съдържание на Gal, Aga и Glc, които са показател за присъствие на имунологично активни АГ и глюкоани в тях. Високото съдържание на РГ-I и GlcA също би трябва да са от значение за активността на липа ПЗК (вж. Глава 5). ПЗК от лавандула прояви по-висока активност при 10 µg/mL, а не при 100 µg/mL, което се обясняваше с антиоксидантната активност на съдържащите се полифеноли в тази проба (вж. Глава 4). Следователно билковите

ПЗК-и могат да активират фагоцитарните левкоцити, които участват в първия вроден механизъм за имунна защита. Както може да бъде видяно от **фиг. 2** контролните стойности за РМА и ОЗР активираната ХЛ бяха много по-високи от тези на спонтанния ХЛ-ен отговор при третиране на кръвта с ПЗ-те. Трите ПЗК-а не повишиха ХЛ-ят отговор на третираните с РМА фагоцити (кръв). Дори лавандуловият ПЗК понижи РМА (ОЗР) активираната ХЛ при 100 µg/mL, проявявайки защитно, антиоксидантно действие върху стимулираните с агресивния активатор клетки. Обратно, другите две проби повишиха ХЛ-ят отговор, предизвикан от третираната с ОЗР кръв и при двете изследвани концентрации (вж. Глави 4 и 5 за ефекта с пречистените фракции).

### 3.2.3. Интестинална имуномодулираща активност

Резултатите от теста за определяне на интестиналната имуномодулираща активност на трите проби са представени вече в Глава 1. Влиянието на ПЗ-те върху клетките от ПП плаки трябва да се разглежда като комплексно въздействие върху различните имунни клетки или като активиране/инхибиране на определен вид клетки, водещо до взаимодействие с други. Независимо, че В-клетките изобилстват в ПП, не бива да се търси непременно директен ефект върху тях с ПЗ-те. Както беше показано по-горе изследваните ПЗ успешно активират Т-клетките и макрофагите от човешка кръвта. На основата на резултатите с белите кръвни клетки (**фиг. 1**) и човешка кръв (**фиг. 2**) може да се предположи, че изучаваните ПЗК-и проявяват интестинална имуномодулираща активност чрез фагоцитарните левкоцити и Т-лимфоцитите. Трите проби индуцираха също продукцията на IL-6 от клетки на ПП и човешки бели кръвни клетки, който по принцип се продуцира от макрофагите и Т-клетките. IL-6 стимулира продукцията на IgA чрез активиране пролиферацията на В-клетките в ПП (Yamada & Kiyohara, 2007).

### 3.3. In vitro антитуморна активност

**Таблица 1.** IC<sub>50</sub> стойности (±SEM) на трите билкови ПЗК-а срещу растежа на различни клетъчни линии след третиране за 48 h.

Проби	Клетъчни линии	IC <sub>50</sub> [µg/mL]
тученица ПЗК	NF(a)	>200
	FL(б)	173.9±1.6
	A549(в)	169.9±9.2
	HeLa(г)	195.4±0.9
	LS180(д)	>200
лавандула ПЗК	NF	>200
	FL	183.7±5.4
	A549	162.0±2.6
	HeLa	170±2.5
	LS180	>200
липа ПЗК	NF	>200
	FL	167.5±17.2
	A549	92.6±2.7
	HeLa	96.7±1.6
	LS180	185.9±6.3

(а)NF (нормални фибробласти), (б)FL (нормални амниотични клетки), (в)A549 (белодробен аденокарцином), (г)HeLa (аденокарцином на яйчниците) и (д)LS180 (аденокарцином на дебелото черво) клетки.

В **табл. 1** са представени IC<sub>50</sub> стойностите на трите ПЗК-а срещу растежа на различни туморни клетъчни линии, определени след 48 h на култивиране. Нормални човешки фибробласти (NF) и амниотични клетки (FL) бяха използвани като контроли. Липовият ПЗК прояви най-висока антитуморна активност срещу A549, HeLa и LS180 клетките. За съжаление обаче резултатите от контролното третиране на NF и FL с трите билкови ПЗК-а

показваха, че контролните клетки се инхибират по сходен начин на туморните клетки. Това означава, че пробите проявяват неспецифично цитотоксично действие съобразно използваните контролни клетки. Този ефект беше проследен и след пречистване на ПЗК-и от липа и лавандула (Глави 4 и 5).

За последващо изясняване на наблюдаваните биологични ефекти е необходимо разграничаване между ПЗ-те и другите съединения в комплексите. Това беше направено за лавандуловия и липовия ПЗК-и в последващи изследвания, потвърждавайки ролята на ПЗ-те в наблюдаваните имуномодулиращи ефекти (Глави 4 и 5).

## Глава 4

### Пектиновите полизахариди от цветовете на обикновената лавандула (*Lavandula angustifolia* Miller) модулират активността на фагоцитарните левкоцити и клетките на чревните Пайерови плаки\*

#### Резюме

От лавандулов цвят бяха получени две пектинови (chPS-L1, chPS-L2) и една полифенолна (chPP-L) фракции, посредством екстракция с кипяща вода, продължително третиране с етанол за отстраняване на нискомолекулни съединения и EPX. chPS-L1 (52.4 kDa) съдържа основно нискоацетилирани и високометоксилирани ХГ-ви региони, и по-малки РГ-I фрагменти, богати на странични вериги от 1,3,5-свързани арабинани и АГ-II. chPS-L2 (21.8 kDa) съдържа преимуществено сходно естерифицирани ХГ-ви региони, последвани от РГ-I области с АГ-II структури и РГ-II. Открояващото се преимуществено съдържание на катехин и епикатехин в chPP-L подсказва, че те участват в слаби (нековалентни) взаимодействия с пектините. chPS-L1 и chPS-L2 фракции стимулираха продукцията на NO от макрофаги и повишиха експресията на  $\beta_2$ -интегрин върху неутрофили, предизвиквайки продукцията на РФК. Високата комплемент-фиксираща активност на chPS-L1 и нейният ефект върху  $\beta_2$ -интегрин се предполага, че са свързани с инхибиращата активност на фракцията върху РМА и OZP предизвиканата продукция на РФК. Това, заедно с потискащия ѝ ефект върху продукцията на NO при едновременно стимулиране с ЛПЗ предполагат, че лавандуловите пектини притежават противовъзпалителна активност. Двете пектинови фракции проявиха и интестинална имуномодулираща активност. Всичко това показва, че лавандуловите продукти, богати на пектинови ПЗ, притежават реален имуномодулиращ потенциал за подпомагане на нормалното функциониране на имунната система. Поради своята антиоксидантна и комплемент-фиксираща активност chPP-L може да бъде ефективна срещу възпалителното активиране на неутрофилите. Подходяща формулировка или отделно използване на лавандуловите пектини и полифеноли може да бъде в полза при суплементирането на потиснатата имунна система и за контрол на възпалението.

Целта на настоящата глава е да се охарактеризира химичната структура и имуномодулиращите свойства на пектиновите ПЗ от *L. angustifolia*, получени от имунологично активния лавандулов ПЗК (Глава 3).

### 3. Резултати и дискусия

#### 3.1. Пречистване и структурна характеристика на лавандуловите пектинови ПЗ

##### 3.1.1. Пречистване и химичен състав на лавандуловите фракции

След предварителното третиране на лавандуловия ПЗК с етанол, получената проба лавандула ПЗК2 беше подложена на EPX (**фиг. 1 (А)**). Наличието на невъглехидратни съединения с диенова и ароматична структура (напр. полифеноли, мастни киселини, протеини) във всички фракционни епруветки беше определено чрез измерване на светлинната абсорбция при 254/280 nm. Това в допълнение на UV-Vis фингърпринтинг анализа на избрани епруветки спомогна за определянето на двете ПЗ-ни (chPS-L1 и -L2) и едната полифенолна (ch-PP-L) фракции. Както може да се види от **фиг. 1 (Б)** трите лавандулови фракции се различават по интензитета на двете области при 201-202 nm и около 280 nm. Първата област произхожда от различни  $\pi$ -връзки като C=O на карбоксилната група в пектина (202 nm) и други съединения, а втората област има  $\lambda_{\max} = 276$  nm типична за катехини и танини. Монозахаридният състав на двете ПЗ-ни фракции показва, че те съдържат основно пектинови полимери с високо съдържание на GalA, последвано от Gal, Ara и Rha (**табл. 1**). chPS-L1 и chPS-L2 фракциите дават положителна реакция с  $\beta$ -глюкозилния реактив на Ярив, което означава, че те съдържат 3,6-свързани галактани или АГ-II. Наличието на редките монозахариди 2-ОМеХyl и 2-ОМеFuc в chPS-L2 показва, че фракцията съдържа РГ-II, което се потвърди също и от присъствието на Kdo в нея. chPS-L1 и chPS-L2 бяха тествани за наличие на ЛПЗ, за които се смята, че са

\*Отпечатано в списание *Carbohydrate Polymers*, 174 (2017) 948-959 с **Erratum: 177 (2017) 469-470.**

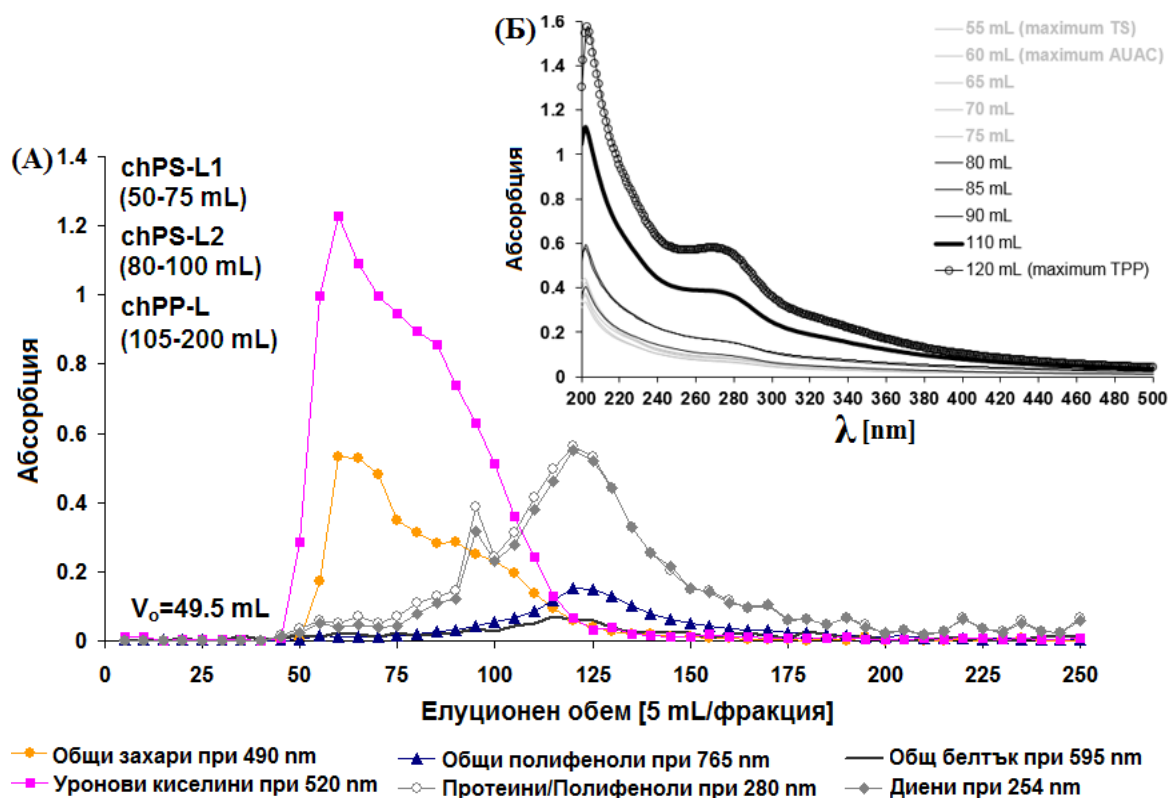
замърсители, способни да повлияят биологичната активност на изследваните съединения. Съгласно проведеният анализ не беше открит маркера за наличие на ЛПЗ – 3-хидрокси тетрадеканова киселина (3-OH-C<sub>14:0</sub>), което предполага, че пробите не са замърсени с ЛПЗ (de Santana-Filho et al., 2012). По-високата интестинална имуномодулираща активност (вж. по-долу) на chPS-L1 доведе до избирането ѝ за последващи по-подробни структурни анализи.

**Таблица 1.** Добив и химична характеристика на лавандуловите пектинови фракции, получени от лавандула ПЗК2.

Показатели	chPS-L1	chPS-L2
Добив [% от лавандула ПЗК]	26.9	19.6
Добив [% от лавандула ПЗК2]	35.2	25.6
Добив [% от изсушените цветове]	0.9	0.7
Общи захари [%]	73.7	58.5
АУС [%]	40.8	44.9
СМ(а) [mol%] (Метоксилно съдържание [%])	63.4 (4.7)	61.0 (5.0)
СА(а) [mol%] (Ацетилно съдържание [%])	16.8 (1.7)	15.3 (1.7)
Общ белтък [%]	1.1	4.2
Общи полифеноли [%]	0.7	2.1
ЛПЗ [%]	н.н.	н.н.
Монозахариден състав		
Ara	10.1 (б) (12.2) (в)	4.6 (5.7)
Rha	5.6 (6.2)	3.7 (4.2)
Fuc	0.7 (0.8)	0.9 (1.0)
Xyl	2.8 (3.4)	2.1 (2.6)
Man	1.7 (1.7)	0.5 (0.5)
Gal	14.3 (14.5)	6.5 (6.7)
Glc	4.7 (4.7)	3.7 (3.8)
GlcA	2.9 (2.8)	1.5 (1.4)
GalA	57.3 (53.8)	76.6 (73.9)
2-OMeXyl	н.н.	+
2-OMeFuc	н.н.	+
Kdo	н.о.	++
АГ-II	++	+
Молекулна маса [Da]	1.05×10 <sup>6</sup> (3.1%) <b>5.24×10<sup>4</sup></b> (92.7%) 0.47×10 <sup>4</sup> (4.2%)	2.18×10 <sup>4</sup>

(а)Изчислени на основата на АУС, moles метоксилни или ацетилни групи за 100 moles of GalA; (б)w/w%, изчислени на основата на общото въглехидратно съдържание; (в)mol% от общото въглехидратно съдържание; н.о. – не е определено; н.н. – не е намерено.

Съдържанието на катехин (854.6 µg/100 mg) и епикатехин (755.3 µg/100 mg) в chPP-L беше доста по-високо от това в алкохолно-разтворимата фракция, получена от лавандула ПЗК (Глава 2). Двата флавоноида са етанолно-разтворими, ето защо слаби взаимодействия с пектините могат да се осъществят и съответно разрушат по време на хроматографирането в солевата среда, създадена от NaCl. Наблюдаваният афинитет на катехините към изследваните ПЗ, показва потенциала на пектина за намаляване на горчивия привкус от тях в напитките при запазване на здравословния ефект за организма от полифенолите.



**Фиг. 1** (А) Елуционен профил на лавандула ПЗК2 на колона със Sephacryl S200 SF (1.5×100 cm) и подвижна фаза 0.2 M NaCl (0.2 mL/min). Обем на пробата 2 mL. (Б) UV-Vis фингърпринтинг на получените пектинови (chPS-L1 и chPS-L2) и полифенолна (chPP-L) фракции. **TS** (общи захари), **AUAC** (Анхидроуроново съдържание) и **TPP** (общи полифеноли).

### 3.1.2. GC-MS определяне състава на гликозидните връзки в chPS-L1

**Таблица 2.** Количествен състав на гликозидните връзки в chPS-L1.

Гликозидни връзки	chPS-L1
T-Araf	4.6(a) (5.6) (б)
1,2-Araf	следи
1,3-Araf	1.4 (1.7)
1,5-Araf	2.8 (3.3)
1,3,5-Araf	1.3 (1.5)
T-Rhap	1.4 (1.6)
1,2-Rhap	1.7 (1.8)
1,4-Rhap	0.1 (0.2)
1,2,4-Rhap	2.4 (2.6)
T-Galp	3.3 (3.4)
1,3-Galp	2.0 (2.1)
1,6-Galp	2.1 (2.2)
1,3,6-Galp	6.8 (6.9)
T-Glcp	1.9 (1.9)
1,4-Glcp	2.8 (2.8)
T-GlcpA	0.7 (0.6)
1,4-GlcpA	1.7 (1.7)
1,2,4-GlcpA	0.5 (0.5)
T-GalpA	4.7 (4.5)
1,4-GalpA	50.4 (47.3)
1,3,4-GalpA	2.2 (2.0)

(a)w/w%, изчислени на основата на общото въглехидратно съдържание; (б)mol% от общото въглехидратно съдържание.

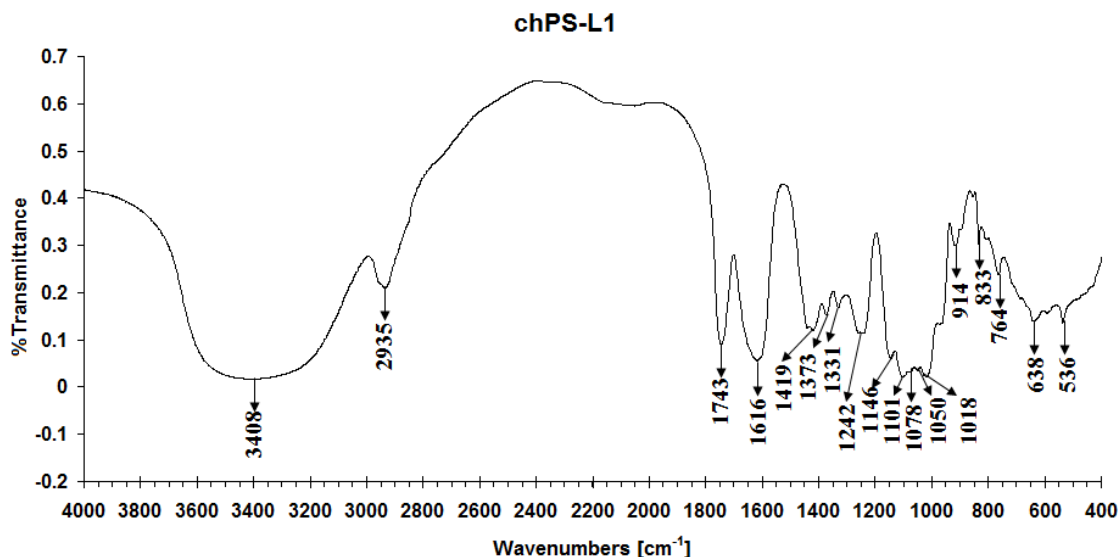
Количественото определяне на състава на гликозидните връзки в chPS-L1 показва, че тя съдържа основно 1,4-свързана GalpA (47.3 mol%), със значително по-малки количества от 1,2- и 1,2,4-свързана Rhap. Фракцията е богата на АГ-II структури (26.7 mol%), показано чрез наличието на 1,3,6-свързана Galp (6.9 mol%), T-Araf (5.6 mol%) и 1,5-свързан арабинан (3.3 mol%) (табл. 2). chPS-L1 е полимер от пектинов тип, съставен основно от ХГ с по-малък РГ-I фрагмент, съдържащ странични вериги основно от 1,3,5-разклонен арабинан и силно разклонен АГ-II. Моларното съотношение между 1,2- и 1,2,4-свързаната Rhap в chPS-L1 е 41:59, показвайки високата степен на заместване на Rha в РГ-I. Три, шест-свързаната Gal и 1,5-арабинаните в страничните вериги на Rha са 25.8 и 12.4 mol%, изчислени от общото съдържание на галактанови и арабинанови структури. Преимуществото на 3,6-

свързаната Gal в страничните вериги е в добро съответствие с резултатите от теста на Ярив. В заключение съдържанието на ХГ (GalA - Rha) и РГ-I (2Rha + Ara + Gal) във фракцията са грубо

определени на 47.6 mol% и 39.1 mol%, съответно (**табл. 1**) (Denman & Morris, 2015). За сравнение, ХГ и РГ-I съдържанието за chPS-L2 е 69.7 и 20.8 mol%, съответно.

### 3.1.3. FT-IR анализ на chPS-L1

FT-IR спектърът на chPS-L1 (**фиг. 2**) съдържа типичните ивици за ПЗ и пектини (Synytsya et al., 2003b). Изчислената СМ на chPS-L1 чрез FT-IR е 61.4%, което е в съответствие с вече определената СМ от 63.4% (**табл. 1**). Сигналите при 1146, 1101 и 1018  $\text{cm}^{-1}$ , а също и тези при 833 (C1-OH,  $\alpha$ -аномер), 764, 638 и 536  $\text{cm}^{-1}$ , потвърждават преимуществото на ХГ-та структура в изследвания ПЗ (Kačuráková et al., 2000). Наличието на арабиногалакто-рамногликанова структура или РГ-I със странични АГ-ви вериги в chPS-L1, се демонстрира от характеристичните сигнали при 1078, 1050 и 914  $\text{cm}^{-1}$  (Kačuráková et al., 2000).



**Фиг. 2** FT-IR спектър на лавандуловата пектинова фракция chPS-L1.

### 3.1.4. ЯМР структурни изследвания на chPS-L1

В **табл. 3** са представени  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  химичните отмествания за определените структурни фрагменти в chPS-L1, намерени от специфичните корелации в HSQC спектъра, а също и в COSY, TOCSY, ROESY, и HMBC спектрите. Разчитането на ЯМР спектрите беше направено с помощта на литературни данни и в съответствие с монозахаридния състав, и състава на гликозидните връзки в chPS-L1 (Shakhmatov et al., 2016). Абсолютната конфигурация на монозахаридите беше предположена от натрупаните данни за пектините (McNeil et al., 1980). ЯМР изследването потвърди, че chPS-L1 е пектинов ПЗ с преимуществен ХГ-ов фрагмент, носещ метилови и ацетилни естери, последван от РГ-I, разклонен с арабинани и АГ-II.

Присъствието на ХГ-я фрагмент, представляващ 1,4-свързана  $\alpha$ -D-полигалактуронова киселина в chPS-L1 е потвърдено от корелациите H1/H4 на  $\alpha$ -D-GalpA-6-OMe единиците при 4.95/4.45 ppm (**A**) и H1/H4 на  $\alpha$ -D-GalpA остатъците при 5.10 (5.05)/4.45 ppm (**B**) в ROESY спектъра (**фиг. 3**). Това беше също доказано чрез взаимодействията през връзките в COSY спектъра. C/H свързванията при 55.5/3.81 ppm за метиловия въглерод и протон на  $\text{CH}_3\text{O}$  групата и при 22.8/2.08 ppm или 22.5/2.17 ppm за метиловия въглерод и протон на  $\text{CH}_3\text{CO}$  групата в HSQC спектъра показват присъствието на метилни и ацетилни естери в chPS-L1. Интензивните корелации през пространството между CO сигнала при 173.4 ppm и  $\text{CH}_3\text{O}$  групата при 3.81 ppm, а също и крос (засечените) пиковете при 173.4/5.05 ppm и 173.4/5.10 ppm в HMBC спектъра показват, че метоксилните групи са локализирани при C6 на  $\alpha$ -D-GalpA в ХГ. Изчислената СМ чрез ЯМР е 62%, използвайки въведената от Synytsya et al. (2003a) формула:  $\text{СМ} = \frac{A_{\text{COOCH}_3}}{A_{\text{C6 tot}}} \times 100$  (%), където А е площта на съответния пик, а  $A_{\text{C6 tot}}$  включва комбинираната площ на C6 пиковете на GalA. Според литературните данни сигналът при 2.08 ppm се отнася до O-3 ацетилирането, а този при 2.17 ppm до O-2 ацетилирането на GalA в ХГ (Perrone et al., 2002). Съотношението на интегралните интензитети на протонните сигнали в  $\text{CH}_3\text{CO}$  при 2.08 и 2.17 ppm е 69:31, от което се вижда преимуществото на O-3 ацетилирането в

пробата. CO сигналът на ацетилната група свързана към O-3 на GalA беше определен с помощта на корелацията при 176.2/2.08 ppm в HMBC спектъра. Протонната последователност в  $\alpha$ -D-GalpA-3-OAc единицата беше намерена съгласно данните на Perrone et al. (2002) чрез следните корелации: 2.08/4.52 ppm (C) и 2.08/4.72 ppm (D) в ROESY спектъра, показващ взаимодействието на CH<sub>3</sub>CO- с H4 и H5 на GalA, съответно; 176.2/4.09 ppm и 176.2/4.52 ppm в HMBC спектъра, даващи взаимодействието в пространството между CH<sub>3</sub>CO- с H2 и H4 на GalA; намирането на съседните протони в COSY спектъра и проверяване на корелациите в рамките на GalA в TOCSY спектъра. Изчислената СА на chPS-L1 чрез ЯМР е 15.4%, с използването на формулата:  $DA = A_{O\text{COCH}_3} / A_{C6 \text{ tot.}} \times 100$  (%), където  $A_{O\text{COCH}_3}$  включва площта само на сигнала при 176.2 ppm, както беше намерено от HMBC спектъра (Synytsya et al., 2003a). Този резултат е в съответствие с колориметрично определената СА (16.8%).

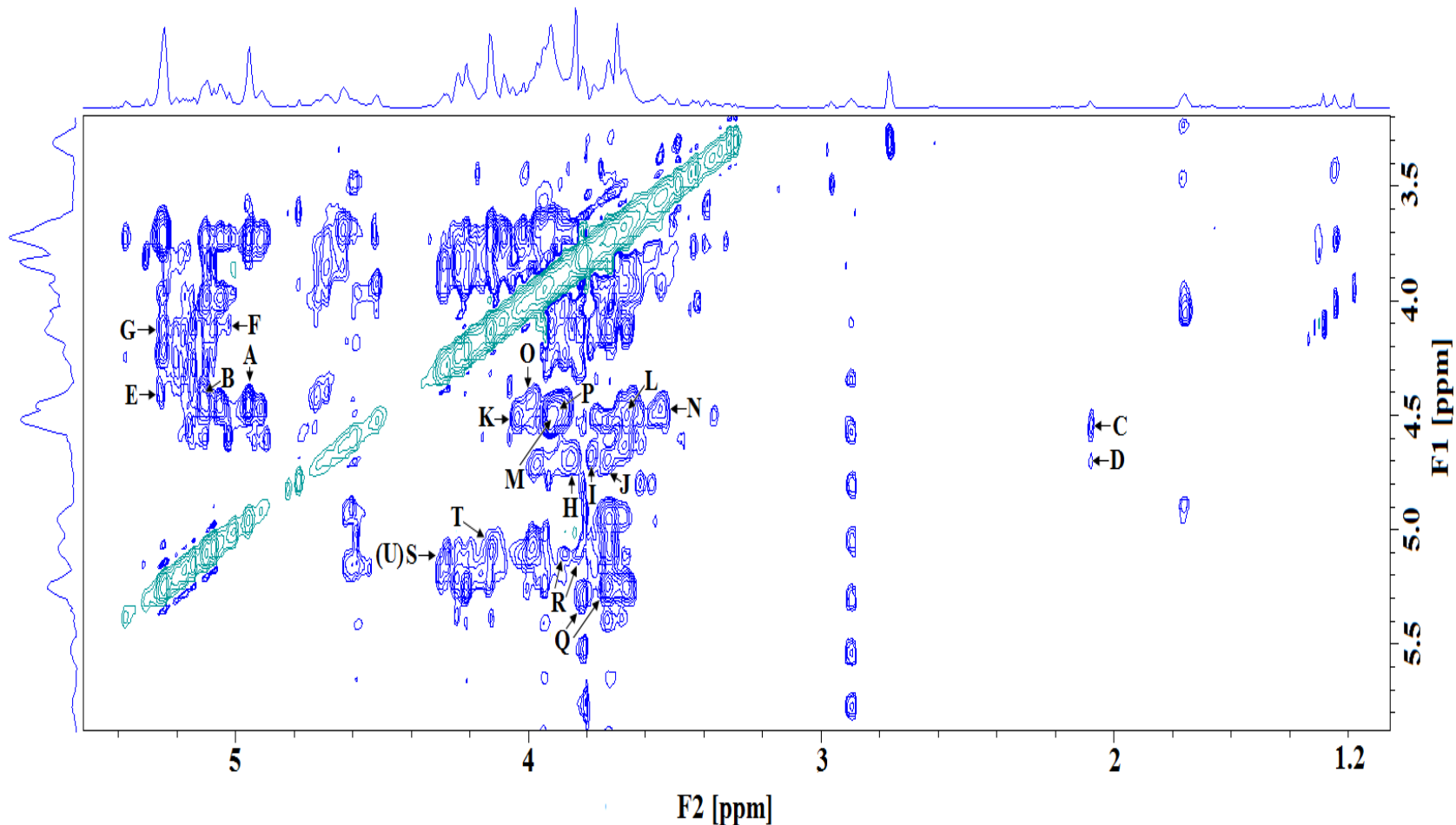
**Таблица 3.** <sup>13</sup>C и <sup>1</sup>H ЯМР химични отмествания  $\delta$  (ppm) на пектинова фракция chPS-L1, отнесени спрямо стандарт DSS.

Остатък	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5:5'	C-6 H-6:6'	CH <sub>3</sub> CO(б)
→4)- $\alpha$ -GalpA-6-OMe-(1→	102.7 4.95	70.6 3.72	71.4 4.00	81.5 4.45	73.2 5.10; 5.05	173.4(a)	
→4)- $\alpha$ -GalpA-3-OAc-(1→	n.d. 5.31	71.6 4.09	73.5 5.14	79.3 4.52	74.0 4.72	177.2	22.8 2.08
→4)- $\alpha$ -GalpA-(1→	102.0 5.10	70.6 3.75	71.4 4.00	81.5 4.45	74.0 4.72	177.2	
→4)- $\alpha$ -GalpA-(1→2	100.3 5.02	71.4 3.93	н. н. 4.13	81.5 4.45	74.4 4.69	177.4	
→2)- $\alpha$ -Rhap-(1→	101.7 5.25	79.3 4.13	71.9 4.00	74.7 3.44	71.9 3.72	19.2 1.25	
→2,4)- $\alpha$ -Rhap-(1→	101.7 5.25	79.3 4.13	72.6 4.09	82.8 3.67	72.1 3.82	19.4 1.30	
$\alpha$ -Araf-(1→	111.8 5.25	84.0 4.21	79.4 3.98	86.7 4.09	64.1 3.72; 3.81	-	
→3,5)- $\alpha$ -Araf-(1→	110.2 5.10	н. н. 4.28	85.1 4.13	83.6 4.29	69.6 3.81; 3.93	-	
→5)- $\alpha$ -Araf-(1→	110.2 5.11	84.0 4.13	79.4 4.03	85.1 4.21	68.4 3.81; 3.87	-	
→3)- $\beta$ -Galp-(1→	106.1 4.69	72.9 3.78	84.8 3.87	71.1 4.24	н. н. 3.73	63.9 3.81	
→6)- $\beta$ -Galp-(1→	106.1 4.45	74.7 3.54	75.5 3.67	71.3 3.98	н. н.	63.9 3.93	
→3,6)- $\beta$ -Galp-(1→	106.1 4.51	73.2 3.67	83.6 4.03	71.4 4.13	76.4 3.93	72.6 3.93; 4.03	

(а)-OCH<sub>3</sub>  $\delta$  при 55.5/3.81 ppm; (б)CH<sub>3</sub>CO  $\delta$  при 176.2 ppm. н. н. (не е намерен)

В ROESY спектъра също се откриват крос-пикове през пространството между H1 на 1,2,(4)- $\alpha$ -L-Rhap и H4 на 1,4- $\alpha$ -D-GalpA остатъци при 5.25/4.45 ppm (E); H2 на  $\alpha$ -L-Rhap и H1 на  $\alpha$ -D-GalpA остатъци при 4.13/5.02 ppm (F); H1 на  $\alpha$ -L-Rhap с H3 на  $\alpha$ -D-GalpA единици при 5.25/4.13 ppm (G). Тези корелации потвърждават наличието на РГ-I скелетната структура: [→4)- $\alpha$ -D-GalpA-(1→2)- $\alpha$ -L-Rhap-(1→4)- $\alpha$ -D-GalpA-(1→]<sub>n</sub> в chPS-L1. Съотношението между интегралните интензитети на H6 на 1,2:1,2,4- $\alpha$ -L-Rhap дава 45:55, показвайки преимуществото на O-4 заместената Rhap, което е в съответствие с резултатите от анализа на гликозидните връзки. Аномерният протон при 4.69 ppm дава корелации през връзките между H1/H3 (4.69/3.87 ppm) (H), H1/H2 (4.69/3.78 ppm) (I) и H1/H5 (4.69/3.73 ppm) (J) на  $\beta$ -D-Galp остатъци в ROESY спектъра, потвърждавайки наличието на [→3)- $\beta$ -D-Galp-(1→3)- $\beta$ -D-Galp-(1→]<sub>m</sub> фрагмента (Makarova et al., 2013). Взаимодействието през пространството между C1 и H6 на  $\beta$ -D-Galp единиците при 106.1/3.93 ppm в HMBC спектъра демонстрира 1,6-гликозилирането в галактановите вериги.

Присъствието на 3,6-галактановата структура беше потвърдено чрез корелации в COSY спектъра между съседните протони и следните свързвания в ROESY спектъра H1/H3 (4.51/4.03 ppm) (K), H1/H2 (4.51/3.67 ppm) (L) и H1/H6 (4.51/3.93 ppm) (M) на  $\beta$ -D-Galp. По същия начин бяха намерени корелациите между съседните протони за 1,6- $\beta$ -D-Galp единици в COSY спектъра и H1/H2 (4.45/3.54 ppm) (N), H1/H4 (4.45/3.98 ppm) (O), и H1/H6 (4.45/3.93 ppm) (P) на същите единици в ROESY спектъра, което потвърждава наличието на  $[\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow ]_0$  фрагмента (Shakhmatov et al., 2014). Основно 3,6-галактаните в пектините са свързани към O-4 на  $\alpha$ -L-1,2,4-Rhap звена през 1,3-галактанов скелет (Schols & Voragen et al., 2002). В ROESY спектъра също може да бъде открита  $[\rightarrow 5)\text{-}\alpha\text{-L-Araf-(1}\rightarrow 5)\text{-}\alpha\text{-L-Araf-(1}\rightarrow ]_p$  структурата чрез крос-пиковите 5.25/3.81;3.72 ppm (Q) за H1/H5 на крайната Araf и 5.10/3.87;3.81 ppm (R) за 1,5-Araf (Shakhmatov et al., 2014). В ROESY спектъра (в допълнение на съответните корелации в COSY спектъра) се откриват също следните взаимодействия: H1/H2 (5.10/4.28 ppm) (S); H1/H3 (5.10/4.13 ppm) (T) и H1/H4 (5.10/4.29 ppm) (U) за 1,3,5-заместените Araf единици (Makarova et al., 2013). Това потвърждава наличието на 1,3,5-разклонена Araf най-вероятно представяйки 1,3,5-арабинаните, свързани към O-4 на  $\alpha$ -L-1,2,4-Rhap звена (Schols & Voragen et al., 2002).



**Фиг. 3.**  $^1\text{H}/^1\text{H}$  ROESY спектър на пектинова фракция chPS-L1. Всяка лат. буква (виж секция 3.1.4.) съответства на важни корелации в ХГ-я фрагмент (A–D); Основната верига на PG-I (E–G); 1,3-Gal верига (H–J); 1,6-Gal верига (N–P); 1,3,6-Gal структура (K–M); 1,5-Ara верига (Q–R); 1,3,5-Ara структура (S–U).



Предполага се също наличие на крайни  $\alpha$ -L-Araf единици свързани към O-6 и/или O-3 на  $\beta$ -D-Galp звена в рамките на 3,6-галактаните, поради положителната реакция на chPS-L1 с реактива на Ярив.

### 3.2. Имуномодулаторен ефект

#### 3.2.1. Комплемент-фиксираща активност

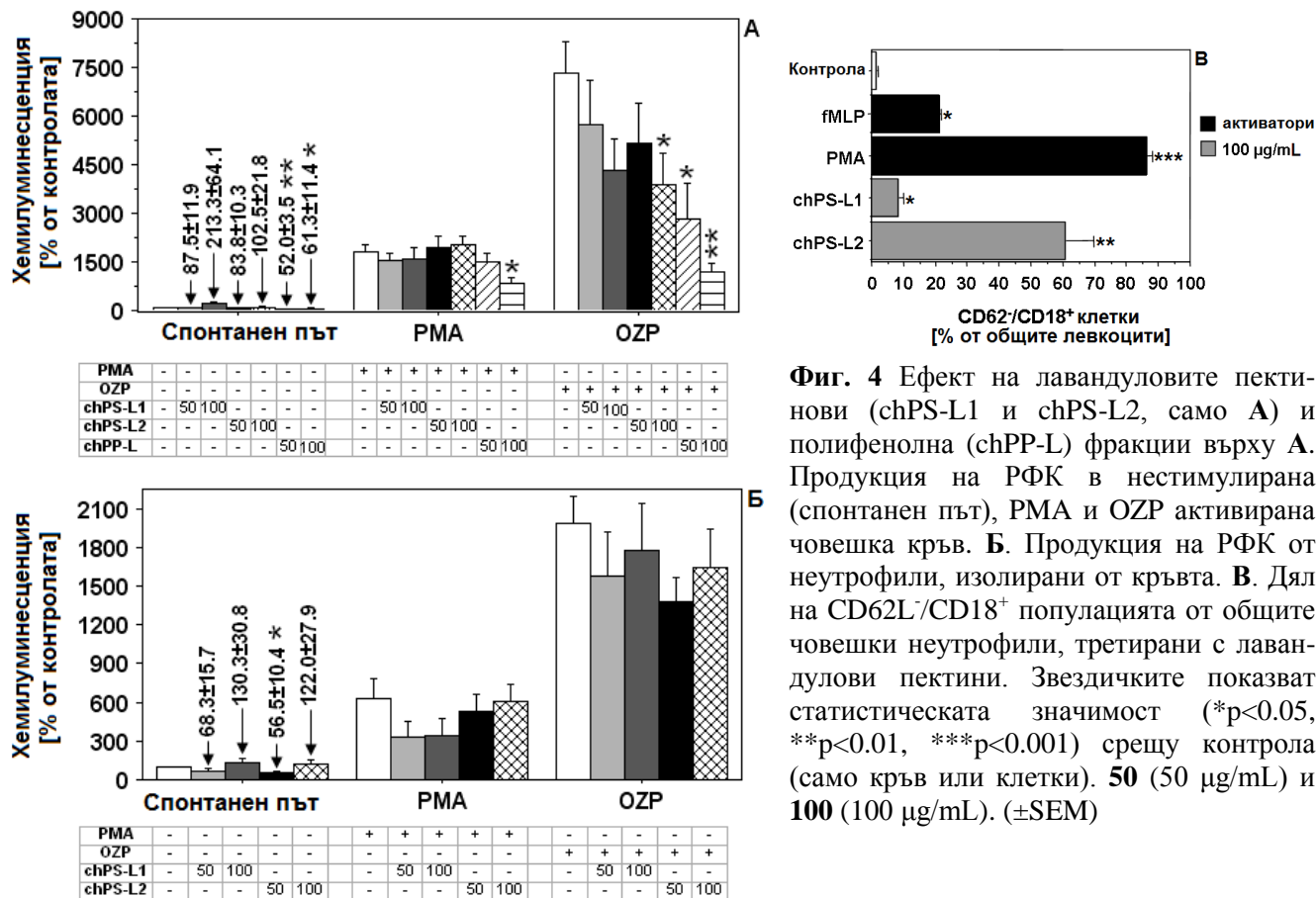
Определените IC<sub>50</sub> стойности на двете пектинови фракции chPS-L1 и chPS-L2 по КП бяха 94.0 и 456.3  $\mu$ g/mL, съответно, показвайки по-високата активност на първата фракция. IC<sub>50</sub> стойностите на chPS-L1 и chPS-L2 по АП бяха 38.9 и 689  $\mu$ g/mL. За сравнение IC<sub>50</sub> стойностите на лавандула ПЗСК бяха 856.8 и 72.2  $\mu$ g/mL по КП и АП, съответно. Следователно беше предположено, че активирането на комплемента с chPS-L1 е не само антитяло-зависимо (КП), но може да бъде резултат от директното взаимодействие на ПЗ-те (АГ-II) със С3 компонента (С3b), стартиращо активирането на АП (Wang et al., 2016). Тези резултати потвърждават водещата роля на някои от лавандуловите пектинови ПЗ в проявлението на активността от комплекса. IC<sub>50</sub> стойностите на chPP-L бяха 86.9 и 539.4  $\mu$ g/mL по КП и АП, съответно. В този случай полифенолите проявяват сходен ефект на по-активната ПЗ-на фракция - chPS-L1, което означава, че те също могат да допринесат за наблюдаваната активност на ПЗ-те в подходяща комбинирана формулировка.

#### 3.2.2. Ефекти върху фагоцитарни левкоцити

##### 3.2.2.1. Човешка кръв и изолирани неутрофили

chPS-L1 повиши спонтанната продукция на РФК в кръвта при по-високата доза от 100  $\mu$ g/mL (**фиг. 4А**). Следователно полифенолите са били отговорни за проявлението на по-ниска активност от лавандуловия ПЗК при по-високата изследвана концентрация от 100  $\mu$ g/mL (Глава 3). При костимулиране с РМА, chPP-L прояви инхибираща активност срещу продукцията на РФК в сравнение с РМА контролата. Това инхибиране беше наблюдавано също в отсъствие на активатор и може да бъде обяснено с радикал-улавящите свойства на полифенолите. При костимулиране с OZP трите проби проявиха инхибиращо действие срещу образуването на РФК. Понеже ефекта на chPP-L върху продукцията на свободни радикали е вече предсказуем, тази проба не беше изследвана по-нататък в тестовете за имуномодулация. При по-високата концентрация chPS-L1 и chPS-L2 леко повишиха ХЛ-ят отговор на изолираните от кръвта неутрофили (**фиг. 4Б**). ПЗ-те фракции не повишиха ХЛ-ят отговор на активираните с РМА клетки, като дори chPS-L1 показва видимо потискащо действие. Наблюдаваният инхибиращ ефект на chPS-L2 върху третираната с OZP кръв се повтори също и с изолираните неутрофили, но не беше така ясно изразен както в кръвната среда. Освен това двете пектинови фракции проявиха статистически значима индукция на неутрофилното активиране, което беше демонстрирано с повишената експресия на  $\beta_2$ -интегрин (CD18) и понижената експресия на L-селектина (CD62L) (**фиг. 4В**). От тези данни беше предположено, че двете ПЗ-ни фракции могат да взаимодействат със CD18. Ето защо инхибиращият или противовъзпалителният ефект на лавандуловите пектини върху OZP активираната продукция на РФК в човешка кръв може да се дължи на тяхното директно взаимодействие със CD18 и комплемент-фиксиращата активност развита в изследваната кръвна среда. CD18 е градивна единица на CR3 и 4, както и на LFA-1, експресирани върху левкоцитите. CR3 се експресира върху фагоцити и е въввлечен във фагоцитозата през (i)C3b свързаните антигени (Ross & Větvička, 1993). Зимосанът е активатор на комплемента по АП чрез свързване към (i)C3b и може да взаимодейства със CR3 върху неутрофилите, индуцирайки фагоцитоза и продукция на супероксидни йони (Fearon & Austen, 1977). Така че OZP (опсонизиран зимосан) (62.5  $\mu$ g/mL) и пектините (50 и 100  $\mu$ g/mL) могат да се съревновават за разпознаване от някои неутрофилни рецептори. Аналогично, chPS-L1 може да се съревновава с РМА за директно свързване със CD18. Потискащият ефект на пектините върху OZP активираната продукция на РФК от изолираните неутрофили се прояви по-слабо вероятно поради липсата на кръвната среда, съдържаща комплементни компоненти и имуноглобулини. Всъщност пектините (100  $\mu$ g/mL) индуцираха по-висок ХЛ-ен отговор с кръвта, отколкото с изолираните неутрофили. Изследванията показват, че лавандуловите

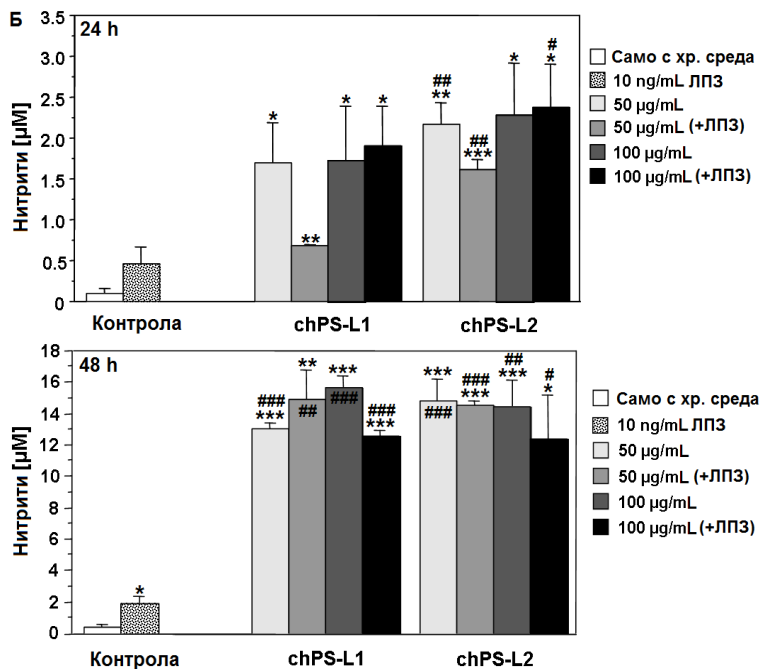
пектини са активна съставка в непречистения лавандулов ПЗК, повлиявайки продукцията на РФК в човешка кръв и (отделно) изолираните от нея неутрофили.



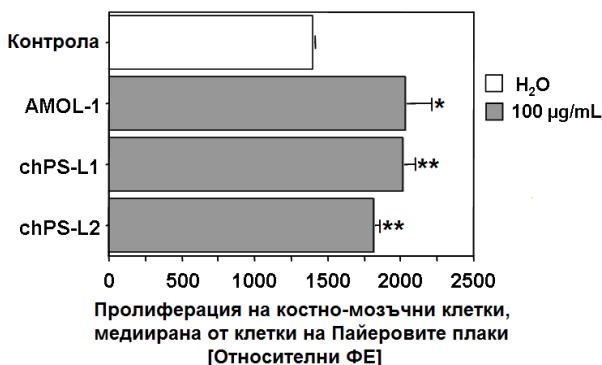
**Фиг. 4** Ефект на лавандуловите пектинови (chPS-L1 и chPS-L2, само **A**) и полифенолна (chPP-L) фракции върху **A**. Продукция на РФК в нестимулирана (спонтанен път), PMA и OZP активирана човешка кръв. **B**. Продукция на РФК от неутрофили, изолирани от кръвта. **B**. Дял на CD62L/CD18<sup>+</sup> популацията от общите човешки неутрофили, третирани с лавандулови пектини. Звездичките показват статистическата значимост (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001) срещу контрола (само кръв или клетки). **50** (50 µg/mL) и **100** (100 µg/mL). (±SEM)

### 3.2.2.2. Миши макрофаги

Понеже chPS-L1 успя да активира антители-иницираното и директно чрез С3 иницираното активиране на СК беше предположено, че нейната висока комплемент-фиксираща активност ще повлияе върху макрофаговия имунен отговор. Ефектът на лавандуловите пектини върху макрофагите беше оценен *in vitro* чрез измерване на експресията на iNOS (не е показано) и свързаната с нея продукция на NO от третираните клетки (**фиг. 5**). Поведението на пектините в симулирана макрофагова инфекция чрез едновременно стимулиране с ЛПЗ също беше изследвано. Не беше наблюдавана значителна разлика между активността на двете ПЗ-ни фракции по отношение продукцията на NO след 24 или 48 h. chPS-L2 прояви обаче леко преимущество в активността след 24 h. Освен това повишението в продукцията на NO, индуцирано от chPS-L1 или chPS-L2 при 100 µg/mL след 48 h на култивиране, беше 9 или 6 пъти по-високо в сравнение с продукцията след 24 h. Тези резултати показват, че лавандуловите пектини сходно на други изследвани ПЗ могат да отключат макрофаговото активиране. Следователно пектините са поне частично отговорни за наблюдаваното повишение на CD14<sup>+</sup> моноцитите и CD64<sup>+</sup> клетъчната популация (фагоцити) предизвикано от непречистения лавандулов ПЗК (Глава 3). Допълнително пектините не бяха токсични за макрофагите (не е показано). При стимулирането на макрофагите с chPS-L1 за 48 h при 100 µg/mL и в присъствие на ЛПЗ нивото на продуцирания NO се понижи. Обратно, в отсъствието на ЛПЗ се повиши. Основно беше наблюдавано, че съчетаването на пектините при 100 µg/mL с 10 ng/mL ЛПЗ не води до синергично повишение на iNOS експресията и продукцията на NO след 48 h. Според литературни данни наблюдаваният феномен или противовъзпалителна активност може да бъде резултат от взаимодействието между пектина и ЛПЗ-те, съревнование за свързването към рецептора (TLR4) или намаляване продукцията на инфламаторни цитокини (TNF-α), стимулирана от ЛПЗ-те (Chen et al., 2006; Gallet et al., 2009).



**Фиг. 5** *In vitro* продукция на NO ( $\pm$ SEM) от миши макрофаги, култивирани самостоятелно или в комбинация с ЛПЗ. Звездичките показват статистическата значимост (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) срещу контрола от нетретиранни клетки (само с хр. среда) и (# $p < 0.05$ , ## $p < 0.05$ , ### $p < 0.001$ ) срещу ЛПЗ.



**Фиг. 6** *Ex vivo* интестинална имуномодулираща активност ( $\pm$ SEM). Повишение в продукцията на костно-мозъчни пролиферативни цитокини от клетки на Пайеровите плаки, култивирани в присъствие или отсъствие на пектиновите фракции (chPS-L1 и chPS-L2). Символите показват статистическата значимост (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) срещу (-) контрола ( $H_2O$ ). AMOL-1 е (+) контрола. ФЕ (флуоресцентни единици).

### 3.3. *In vitro* антитуморна активност

Антитуморната активност на chPS-L1 и chPP-L беше тествана при 25 и 50  $\mu\text{g/mL}$  срещу различни туморни клетки (вж. в дисертацията) при използването на нормални (FL) клетки като контрола (не е показано). В тази и последващите глави тестването на антитуморната активност на ПЗ-те беше извършено при ниски концентрации, за да се открият пробите с потенциална активност, имайки предвид малките количества, в които те достигат реално до туморните клетки. Полифенолната фракция беше включена вместо chPS-L2 с цел да се сравни инхибиращият ефект на лавандуловите полифеноли и пектини. chPS-L1 прояви неспецифичност на действие спрямо туморните клетъчни линии и използваните контролни клетки, както беше наблюдавано при изходния комплекс (Глава 3). За разлика от пектиновата фракция, полифенолната фракция потисна слабо развитието на нормалните FL клетки едва след 72 h на третиране.

В предварително проучване беше установено, че полиуронидите (представящи пектините) в промишлено отдестилирани лавандулови цветове са 18.9%, а тези в отдестилираните стръкове 19.1%. Ето защо получените вторични продукти от дестилацията могат да бъдат източник на БА ПЗ в допълнение на нискомолекулните вещества.

### 3.2.3. Интестинална имуномодулираща активност

Двете фракции показаха статистически значима интестинална имуномодулираща активност ( $p < 0.01$ ), сравнима с тази на положителната контрола AMOL-1 (фиг. 6). chPS-L1 има по-високо съдържание на АГ-II от chPS-L2, което обяснява и нейната по-висока комплемент-фиксираща и интестинална имуномодулираща активност (Yamada & Kiyohara, 2007). Резултатите потвърждават, че лавандуловите пектини са въввлечени в проявяваната активност на непречистения лавандулов ПЗК върху ПП (Глава 3). Комплемент-фиксиращата активност и стимулиращият ефект върху неутрофилите и макрофагите на лавандуловите пектини допринасят за проявлението на интестиналната имуномодулираща активност през ПП.

## Глава 5

**Пектините от цветовете на сребролистната липа (*Tilia tomentosa* Moench) проявяват двойствен начин на действие върху фагоцити, като мономери от  $\beta$ -глюкуронова киселина избилстват в техните рамногалактуронани тип I\***

### Резюме

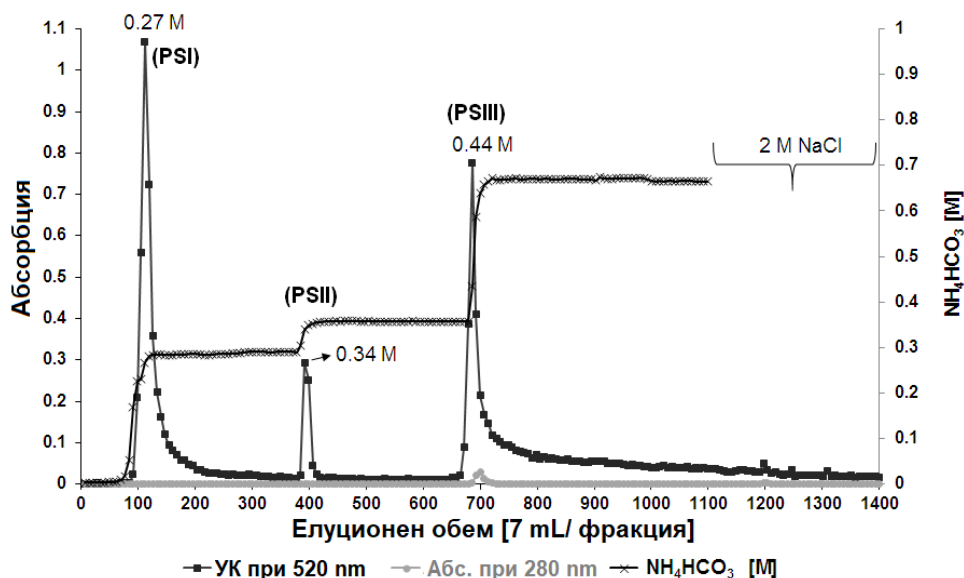
Цветовете на сребролистната липа съдържат различни пектини (PSI-PSIII) с имуномодулиращи свойства. PSI е нискоестерифициран пектинов ПЗ с преимуществен ХГ-ов регион, последван от РГ-I със странични вериги от АГ-II и следи от РГ-II областта. PSII и PSIII са необичайни глюкуронидирани РГ-I полимери. PSIII е уникален високомолекулен РГ-I, имащ почти напълно O-3 глюкуронидирани GalA единици с >30% O-3 ацетилиране при Rha остатъци. Липовите пектини предизвикаха продукцията на РФК и NO в нестимулирана кръв и макрофаги, съответно. В същото време те потиснаха OZP активираната продукция на РФК и индуцираните от ЛПЗ-те iNOS експресия, и продукция на NO. Този двойствен начин на действие предполага тяхната потенциална противовъзпалителна активност, което е вече известно за екстрактите от сребролистната липа. PSI прояви най-високата комплемент-фиксираща и макрофаго-стимулираща активност, като стимулира и имунните клетки от чревните ПП. PSIII беше активен върху нестимулирани неутрофили, като предизвика експресията на  $\beta_2$ -интегрин, показвайки че ацетилираният и силно глюкуронидиран РГ-I може да прояви имуномодулиращо действие през фагоцитите.

Целта на настоящата глава е да се охарактеризират химичното разнообразие и имуномодулиращите свойства на пречистените пектинови ПЗ от цветовете на *T. tomentosa* от липовия ПЗК2 (Глава 2 и 3).

### 3. Резултати и дискусия

#### 3.1. Пречистване и структурна характеристика на липовите ПЗ

##### 3.1.1. Пречистване и химичен състав на липовите полизахаридни фракции



**Фиг. 1** Пречистване и фракциониране на полизахаридите от липа ПЗК2 на колона с DEAE-Sephrose FF (1.5×50 cm) чрез стъпаловидно елуиране с по 300 mL: 0.35, 0.45 и 1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (1 mL/min). Колоната е промита предварително със 170 mL д. вода (V<sub>c</sub> = 85 mL). При последващо промиване с 2 M NaCl не се наблюдава елуиране на въглехидрати. **УК** (уроновни к-ни), **Абс.** (абсорбция).

Липовият ПЗ-ен комплекс, липа ПЗК2 беше подложен на АОХ на DEAE-Sephrose FF (-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), като бяха получени 3 ясно изразени ПЗ-ни фракции PSI-PSIII чрез стъпаловидно

\*Отпечатано в списание *Carbohydrate Polymers*, 175 (2017) 178-191.

елуиране с 0-1 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (фиг. 1). Резултатите от анализа за определяне на АУС на пробите (табл. 1) показват, че получените ПЗ имат типичен киселинен характер, както е открито и от Kram & Franz (1983) за цветовете на *T. cordata*. Rha съдържание е високо във всички фракции, произтичайки от високото Rha съдържание (11.5%) в изходния липов ПЗК, за който беше потвърдено чрез FT-IR анализ, че е богат на РГ-I структури (Глава 3). Стойностите за Rha и GalA са сходни в PSII и PSIII. Теоретично погледнато съотношението GalA:Rha в основната верига на РГ-I клоновете към 1:1, като това съотношение за PSI, II и III е 6.2, 1.3 и 1.1, съответно. Съгласно изчисленията по Denman & Morris (2015) приблизително съдържанието на ХГ (%) в PSI е 57%, следвайки 8.3% за PSII и 2.0% за PSIII. Съдържанието на GlcA в PSII и PSIII е нетипично високо в сравнение с другите монозахариди. В Глава 3 беше изчислено, че съдържанието на GlcA в липовия ПЗК е 30-31% от уронидите в пробата. Обикновено GlcA (4-O-Me-GlcA) се съдържа в малки количества, свързана към страничните вериги на АГ-те (Schols & Voragen, 2002). Съотношението GlcA:Rha е 0.7 и 1.0 за II и III, което показва, че уроновата киселина не е незначителен заместител в РГ-I. Данните от химичната характеристика показват, че цветовете на сребролистната липа съдържат два структурно различни пектинови ПЗ – нискоестерифициран типичен пектинов ПЗ PSI (M<sub>w</sub>= 28.2 kDa) и необикновени, високо-ацетилизирани (2.9-3.3%) и високоглюкурононидирани РГ-I PSII (M<sub>w</sub>= 949 kDa) и PSIII (M<sub>w</sub>= 382 kDa). PSI и PSII съдържат арабино-3,6-галактани или АГ-II, като PSI се отличава с най-високото количество на Ara и Gal, последван от PSII. Трите проби не са замърсени с ЛПЗ.

**Таблица 1.** Добив и химична характеристика на пектиновите фракции от сребролистна липа, получени от липа ПЗК2 чрез АОХ.

Параметри	PSI	PSII	PSIII
Добив [% от липа ПЗК]	9.0	2.6	8.6
Добив [% от липа ПЗК2]	19.1	5.4	18.2
Добив [% от изсушените цветове]	0.56	0.16	0.53
Общи захари [%]	55.2	67.5	64.8
АУС [%]	46.8	39.7	39.9
СМ(а) [mol%] (Метоксилно съдържание [%])	13.1 (1.1)	н.н.	н.н.
Ацетилено съдържание [%]	0.6	3.3	2.9
Общ белтък [%]	0.4	н.о.	0.5
ЛПЗ [%]	н.н.	н.н.	н.н.
Монозахариден състав			
Ara	7.5(б) (9.2) (в)	2.3 (2.7)	1.9 (2.2)
Rha	11.0 (12.3)	29.2 (32.3)	29.8 (33.1)
Fuc	следи	следи	следи
Xyl	1.9 (2.3)	0.9 (1.1)	1.0 (1.2)
Man	0.1 (0.1)	0.4 (0.4)	0.2 (0.2)
Gal	6.7 (6.8)	4.7 (4.8)	3.4 (3.5)
Glc	3.3 (3.4)	3.6 (3.6)	2.2 (2.3)
GlcA	1.6 (1.5)	21.4 (20.0)	29.6 (27.8)
GalA	67.9 (64.3)	37.5 (35.1)	31.8 (29.8)
Kdo	+	н.о.	н.о.
AGII	+	+	н.н.
Молекулна маса [Da]		9.73 × 10 <sup>5</sup> (68.0%) 1.31 × 10 <sup>5</sup> (14.7%) 0.14 × 10 <sup>4</sup> (17.3%)	3.91 × 10 <sup>5</sup> (78.3%) 5.05 × 10 <sup>4</sup> (15.4%) 0.14 × 10 <sup>4</sup> (6.3%)
(M <sub>w</sub> ) (г)	2.82 × 10 <sup>4</sup>	(9.49 × 10 <sup>5</sup> )	(3.82 × 10 <sup>5</sup> )
(M <sub>n</sub> ) (д)		(6.81 × 10 <sup>5</sup> )	(3.14 × 10 <sup>5</sup> )

(а)Изчислено на основата на АУС, moles метоксилни групи за 100 moles GalA; (б)w/w%, изчислено на основата на общото въглехидратно съдържание; (в)mol% от общото въглехидратно съдържание; (г)Средна молекулна маса; (д)Средна бройна молекулна маса; н.н. – не е намерено; н.о. – не е определено.

### 3.1.2. GC-MS определяне състава на гликозидните връзки

**Таблица 2.** Количествен състав на гликозидните връзки в PSI и PSIII.

Гликозидни връзки	PSI(в)	PSIII(г)
T-Araf	3.4(a) (4.2) (б)	-
1,3-Araf	0.3 (0.4)	-
1,5-Araf	3.0 (3.6)	-
1,3,5-Araf	0.8 (1.0)	-
T-Rhap	1.2 (1.4)	-
1,2-Rhap	8.4 (9.4)	29.8 (33.1)
1,2,4-Rhap	1.4 (1.6)	-
1,3-Fucp	следи	-
1,4-Xylp	1.9 (2.3)	-
T-Galp	2.6 (2.6)	-
1,3-Galp	0.9 (0.9)	-
1,6-Galp	1.1 (1.1)	-
1,3,6-Galp	2.1 (2.2)	-
1,4-Glcp	3.3 (3.4)	2.2 (2.3)
T-GlcpA	1.6 (1.5)	29.6 (27.8)
T-GalpA	5.3 (5.0)	-
1,4-GalpA	59.4 (56.2)	1.8 (1.7)
1,3,4-GalpA	3.3 (3.1)	30.0 (28.1)

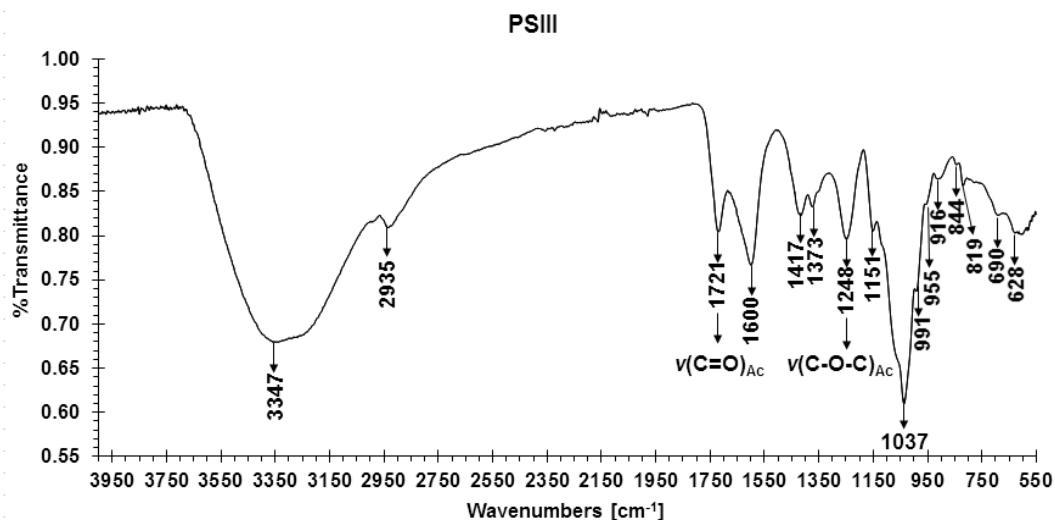
(a)w/w%, изчислени на основата на общото въглехидратно съдържание; (б)mol% от общото въглехидратно съдържание; (в)2.5 M CF<sub>3</sub>COOH за 2 h при 100°C; (г)90% HCOOH за 6 h при 120°C и последващ хидролиз с добавянето на 5 mL д. вода за 1 h при 100°C.

PSI е съставен преимуществено от 1,4-свързана GalpA (59.4%) и 1,2-свързана Rhap (8.4%), с незначително количество 1,2,4-свързана Rhap (1.4%), най-вероятно заместена с арабинани и силно разклонени АГ със структурни характеристики на АГ-II (табл. 2). Това показва, че PSI съдържа основно ХГ и РГ-I структури. Тези открития са в добро съответствие с изчисленията по Denman & Morris (2015) и резултатите от теста на Ярив за съдържание на АГ-II. Определено е, че 1,2,4-свързаната Rhap е 12.7% от общото

количество Rha в PSI. Наличието на 1,3,4-свързани GalpA единици в PSI и III не е нетипично и то може да бъде показател за наличие на РГ-II, и други заместени галактуронани. Обикновено тези фрагменти обаче не заемат голям дял в изходните ензимно нетретирани пектини (Schols & Voragen, 2002). Може да се каже, че 1,3,4-свързаната GalpA в PSI се отнася към РГ-II структурите, понеже тази проба е Kdo положителна. Допълнително метилираният PSIII беше подложен на формолиза, за да се извърши пълен хидролиз на гликозидните връзки в този ПЗ. След формолизата на метилирания PSIII се получават 30% 1,3,4-свързана GalpA, което е в сравнимо количество с това на 1,2-свързаната Rhap (29.8%) и Т-свързаната GlcpA (29.6%). Полученото съотношение 1:1:1 на 1,2-Rhap:1,3,4-GalpA:T-GlcpA доказва, че мономерите от GlcA са O-3 свързани към GalpA в РГ-I. Понеже GlcA е закачена като краен остатък в пробата, става дума само за мономери от нея. Според ПЗ-ната класификация глюкуроноидираният РГ-I може да бъде наименуван ацетилян глюкуроно-рамногалактуронан тип I (GlcA-РГ-I). Съгласно Denman & Morris (2015) беше изчислено, че съдържанието на РГ-I в PSI е 36.2%. За изчисляване съдържанието на РГ-I в PSIII формулата беше модифицирана с добавяне съдържанието на GlcA, при което се получават 94,5%. Съотношението 1,4-свързана GalpA:(1,4+1,3,4)-свързана GalpA от табл. 2 дава стойност от 5.7%, което показва, че незначителна част от PSIII не е O-3 глюкуроноидирана. Поради ниския добив на PSII не беше възможно да се определи състава на гликозидните връзки в тази проба. PSII се характеризира със сходно ацетилно съдържание на PSIII и също високо съдържание на GlcA от 21.4%. Следователно беше предположено, че мономери от GlcA са O-3 свързани към GalpA. Изчисленото съдържание на РГ-I в тази фракция е 86,8%.

### 3.1.3. ATR-FT-IR анализ на PSIII

Наличието на ацетилни естери в PSIII беше също потвърдено чрез ИЧ анализ (фиг. 2). В спектъра на PSIII се откриват две важни ивици с еднакъв интензитет при 1248 cm<sup>-1</sup> ν(C-O-C)<sub>Ac</sub> и 1721 cm<sup>-1</sup> ν(C=O)<sub>Ac</sub> за ацетилните групи, които изчезват при осапунване на пробата с NaOH. Присъствието на сигналите при около 1151, 1037, 991, 958 и 819 cm<sup>-1</sup> също се намира и в спектъра на липа ПЗК2 (Глава 3). Повечето от споменатите пикове, с допълнение от тези при 916 и 844 cm<sup>-1</sup>, регистрирани в спектъра на PSIII показват наличието на РГ-I скелетната структура (Kačuráková et al., 2000).

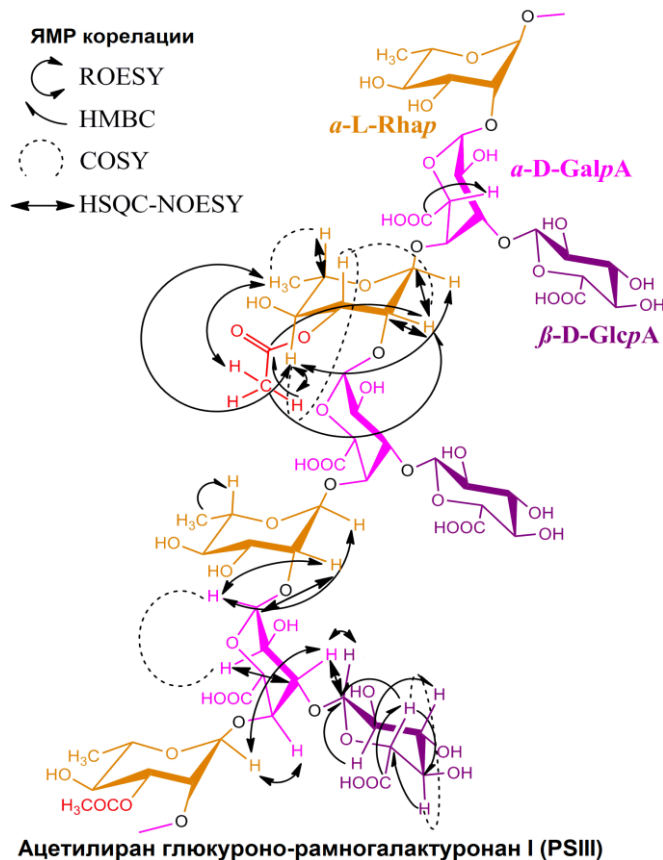


Фиг. 2 ATR-FT-IR спектри на PSIII преди осапунване (деацетилиране) с NaOH.

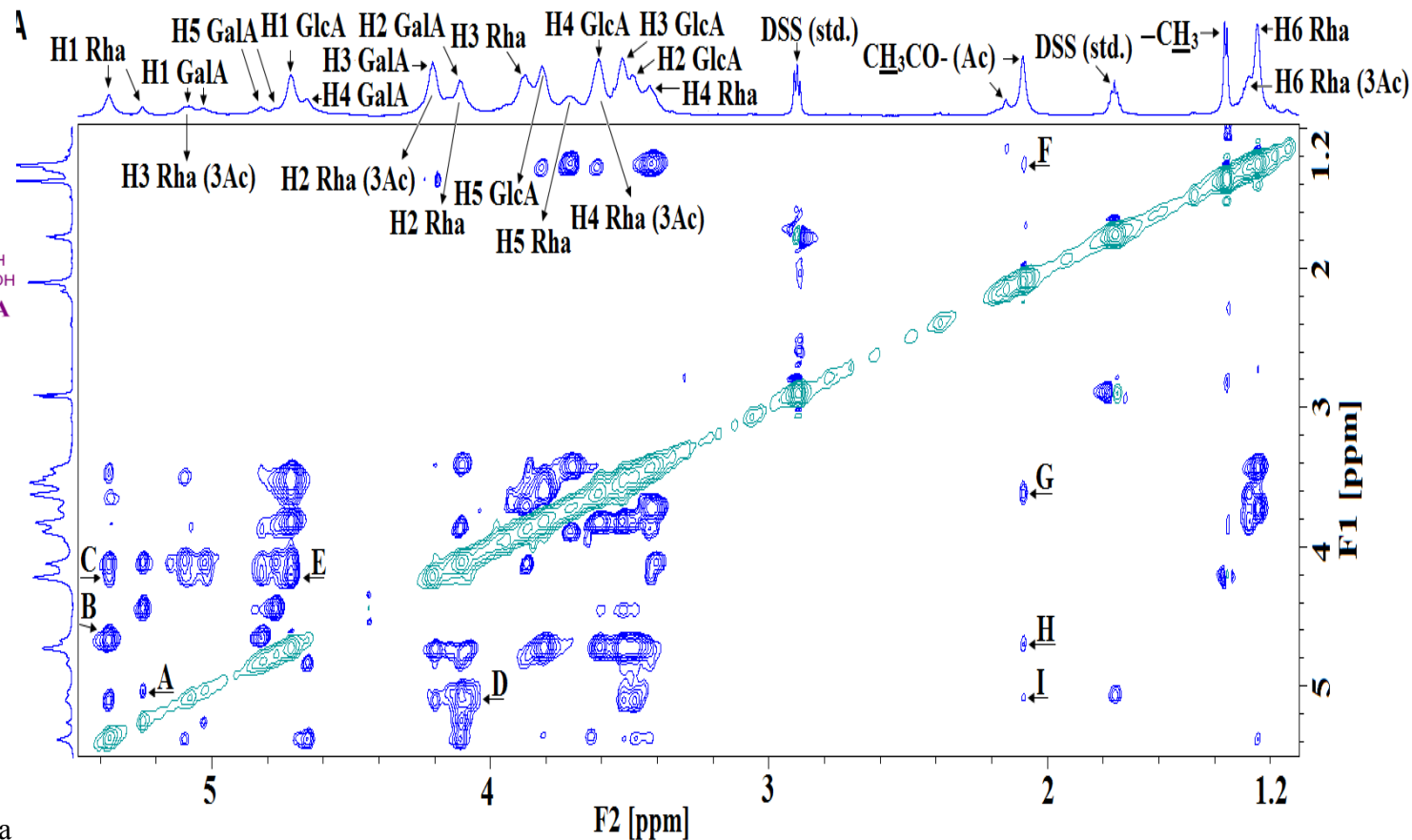
### 3.1.4. ЯМР структурни изследвания на PSIII

Едномерни и двумерни хомо- и хетероядрени ЯМР експерименти на 800 MHz високоразделителен ЯМР спектрометър бяха проведени, за да се определят структурните особености по заместването на GalA с GlcA и за да се локализира ацетилните естери в PSIII. В табл. 3 са представени  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  химични отмествания, открити от COSY, TOCSY, ROESY, HSQC, HMBC и HSQC-NOESY спектрите на PSIII, определени съгласно литературни данни и в съответствие с монозахаридния състав, и типа на гликозидните връзки (Renard et al., 1999; Sengkhamparn et al., 2009; Shakhmatov et al., 2016; Shimizu & Tomoda, 1985). ЯМР изследването потвърди, че PSIII е GlcA-РГ-I, който е преимуществено ацетилиран при *O*-3 на  $\alpha$ -L-Rhap. *O*-3 глюкуронидираната структура в РГ-I е била открита в слюзните вещества от вътрешната кора на *Hydrangea paniculata* Sieb. през 1976-1977 г. (Tomoda & Satoh, 1977). Структура не е често срещана в растенията и според проучените достъпни литературни данни не е била изолирана от цветовете на растенията досега (Shimizu & Tomoda, 1985). Sengkhamparn et al. (2009) са установили за първи път, че Rha в РГ-I от бамя може да бъде *O*-3 ацетилирана. Установеното в настоящата работа едновременно високо глюкуронидиране (почти 1:1) при GalA и ацетилиране при Rha в пектинов ПЗ не се среща в литературата.

В ROESY спектъра се намират следните крос-пикове за H1 на  $\alpha$ -L-Rhap и H1 на  $\alpha$ -D-GalpA единици при 5.25/5.02 ppm (**A**); H1 на вътрешната  $\alpha$ -L-Rhap с H4 на  $\alpha$ -D-GalpA остатъци при 5.37/4.66 ppm (**B**); H1 на  $\alpha$ -L-Rhap с H3 на  $\alpha$ -D-GalpA звена при 5.37/4.20 ppm (**C**); H2 на  $\alpha$ -L-Rhap с H1 на  $\alpha$ -D-GalpA единици при 4.11/5.02 (5.09) ppm (**D**) (фиг. 3). Тези корелации потвърждават присъствието на основната верига на РГ-I:  $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA}\text{-}(1\rightarrow)]_n$  в PSIII. Отсъствието на корелация между H1 и H4 на  $\alpha$ -D-GalpA единици доказва, че наистина ХГ-ът е незначителна част в структурата на полимера, както беше показано по-горе. По-интригуващ е крос-пикът през пространството между H1 на крайно свързаните  $\beta$ -D-GlcpA остатъци с H3 на 1,4- $\alpha$ -D-GalpA звена при 4.71/4.20 ppm (**E**) в ROESY спектъра (фиг. 3). Съответната корелация през гликозидната връзка е намерена и между C1 на  $\beta$ -D-GlcpA и H3 на 1,4- $\alpha$ -D-GalpA при 106.6/4.20 ppm в HSQC-NOESY спектъра (не е показано). Това показва, че 1,4- $\alpha$ -D-GalpA единици в РГ-I са *O*-3 заместени с мономери от  $\beta$ -D-GlcpA. Химичните отмествания за H2 (4.10 ppm), H3 (4.20 ppm) и H4 (4.66 ppm) на  $\alpha$ -D-GalpA и H1 на 1,2- $\alpha$ -L-Rhap показват значително изместване в по-слабо поле в сравнение с литературните данни за пектините (Shakhmatov et al., 2016). Това е било наблюдавано и от Renard et al. (1999), и потвърждава, че  $\alpha$ -D-GalpA е заместена извън основната верига на РГ-I, и че заместването повлиява близко разположената Rha. Бета-аномерната конфигурация на GlcA беше предложена директно от определеното химично отместване на H1 протона при 4.71 ppm (Renard et al., 1999).



**Фиг. 4** Химична структура на PSIII, определена чрез GC-MS метилизационен анализ за типа на гликозидните връзки и 2D ЯМР анализ на монозахаридната последователност. Показани са най-важните Н/Н и С/Н корелации.



**Фиг. 3** Двумерен ЯМР анализ на липовата пектинова фракция PSIII. А)  $^1\text{H}/^1\text{H}$  ROESY спектър. Всяка лат. буква съответства на важни корелации (виж секция 3.1.4.).

Определянето на карбоксилния карбонилен въглерод C6 на двете уронови киселини беше направено от HMBC спектъра, където се открива следната информация: протонът H5 на 1,3,4- $\alpha$ -*D*-GalpA при 4.77 ppm взаимодейства с въглеродите при 176.2 ppm. Аналогично, H5 протонът на  $\beta$ -*D*-GlcрA, резониращ при 3.81 ppm се свързва с въглеродите при 177.1 ppm. Отсъствието на сигнал при 53-55 ppm, произхождащ от  $\text{OCH}_3$  на метилестерната група потвърждава, че PSIII е с много ниска CM или не е метоксилиран (Shakhmatov et al., 2016).



**Таблица 3.**  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  ЯМР химични отмествания ( $\delta$  в ppm) на ацелирания глюкуроно-рамногалактуронан I (PSIII), отнесени спрямо DSS.

Остатък	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5	C-6 H-6	$\text{CH}_3\text{CO}$
$\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-GalpA-3-O-}\beta\text{-GlcA-(1}\rightarrow 2$	100.3 5.02	70.1 4.10	81.3 4.20	80.3 4.66	73.5 4.77	176.2	
$\rightarrow 2\text{-}\alpha\text{-Rhap-(1}\rightarrow$	101.3 5.25	79.3 4.11	72.2 3.87	74.7 3.42	71.8 3.71	19.2 1.24	
$\rightarrow 2\text{-}\alpha\text{-Rhap-3-OAc-(1}\rightarrow$	101.3 5.37	70.4 4.20	- 5.09	78.2 3.61	72.8 4.11	19.2 1.28	22.9 2.09
$\beta\text{-GlcA-(1}\rightarrow$	106.6 4.71	76.4 3.49	78.4 3.52	74.3 3.61	78.2 3.81	177.1	

Крос-пиковите в HSQC и HSQC-NOESY спектрите за въглеродните и протонните сигнали от метилната група на естерно-свързаната оцетна киселина при 22.9/2.09 ppm и 22.9/2.15 ppm потвърждават наличието на естерно-свързана оцетна киселина в PSIII. Корелации между ацетилните метилни протони и ацетилните карбонилни въглероди се наблюдават в C6 региона на уроновите киселини в HMBC спектъра. C6 сигналите на двата уронови киселинни остатъка и  $\text{CH}_3\text{CO}$  се препокриват. Наличието на два пика за  $\text{CH}_3\text{CO}$  групата при 2.09 ppm и 2.15 ppm предполага O-3 и O-2 ацелиране в PSIII. Сигналът при 2.09 ppm е по-интензивен (интегрално съотношение: 2.09:2.15 ppm 3,8:1, т.е. преимущество на O-3 ацелирането) и съгласно литературните данни е отнесен към O-3 ацелирането на GalA в ХГ, а също и на Rha в РГ-I (Renard & Jarvis, 1999; Sengkhampan et al., 2009). Сигналът на протоните от метиловата група при 2.09 ppm се корелира с пиковите при 1.28 ppm (F), 3.61 ppm (G), 4.71 ppm (H) и 5.09 ppm (I) в ROESY спектъра (фиг. 3). Корелацията G е най-интензивна, подкрепяйки близостта между протона при 3.61 ppm с ацетилния протон. Корелацията F показва, че ацетилните групи са в рамките на Rha пръстен. Анализът на COSY, TOCSY, ROESY, HMBC и HSQC-NOESY спектрите е в съответствие с преимущественото разположение на ацетилните групи при O-3 на 1,2- $\alpha$ -L-Rhap единици. Това се показва чрез изместването в по-слабо поле на H2 (4.20 ppm), H3 (5.09 ppm), H4 (3.61 ppm) и H5 (4.11 ppm) на 1,2- $\alpha$ -L-Rhap остатъци. При изчисляване CA на PSIII на основата на Rha, вместо на GalA, се определя, че 33.3% от Rha единици са ацелирани. Съотношението между интегралните интензитети на H6 от 1,2- $\alpha$ -L-Rhap:1,2- $\alpha$ -L-Rhap-3OAc е 2.16:1, показвайки че приблизително 32% от Rha единици са ацелирани. Подобно Sengkhampan et al. (2009) наблюдават изместване в по-слабо поле на H2 (4.22 ppm), H3 (5.24 ppm) и H5 (3.91 ppm) на O-3 ацелираните 1,2,4- $\alpha$ -L-Rhap звена в пектин изолиран от бамя. Корелацията между резонансите при 2.09 ppm и 4.71 ppm в ROESY спектъра предполага, че протонът при 4.71 ppm е конформационно приближен до ацетилната група. Монозахаридният състав и предварителният анализ на типа на гликозидните връзки на PSIII показват, че фракцията съдържа малко количество Gal, която може да бъде свързана към O-4 на 1,2- $\alpha$ -L-Rhap-3-OAc единици. Следователно беше предположено, че сигналът при 4.71 ppm съдържа аномерният протон на T- $\beta$ -D-Galp остатък (Shakhmatov et al., 2015). Това се подкрепя от откритието, че сигналът за протона при 4.71 ppm (106.6 ppm) е съседен до този на протона при 3.52 ppm (74.3 ppm) в COSY спектъра и от един крос-пик между 106.6 ppm и 3.61 ppm в HSQC-NOESY спектъра (не е показано). На фиг. 4 по-горе е представена моделна структура на PSIII с някои важни Н/Н и С/Н взаимодействия.

## 3.2. Имуномодулиращи ефекти

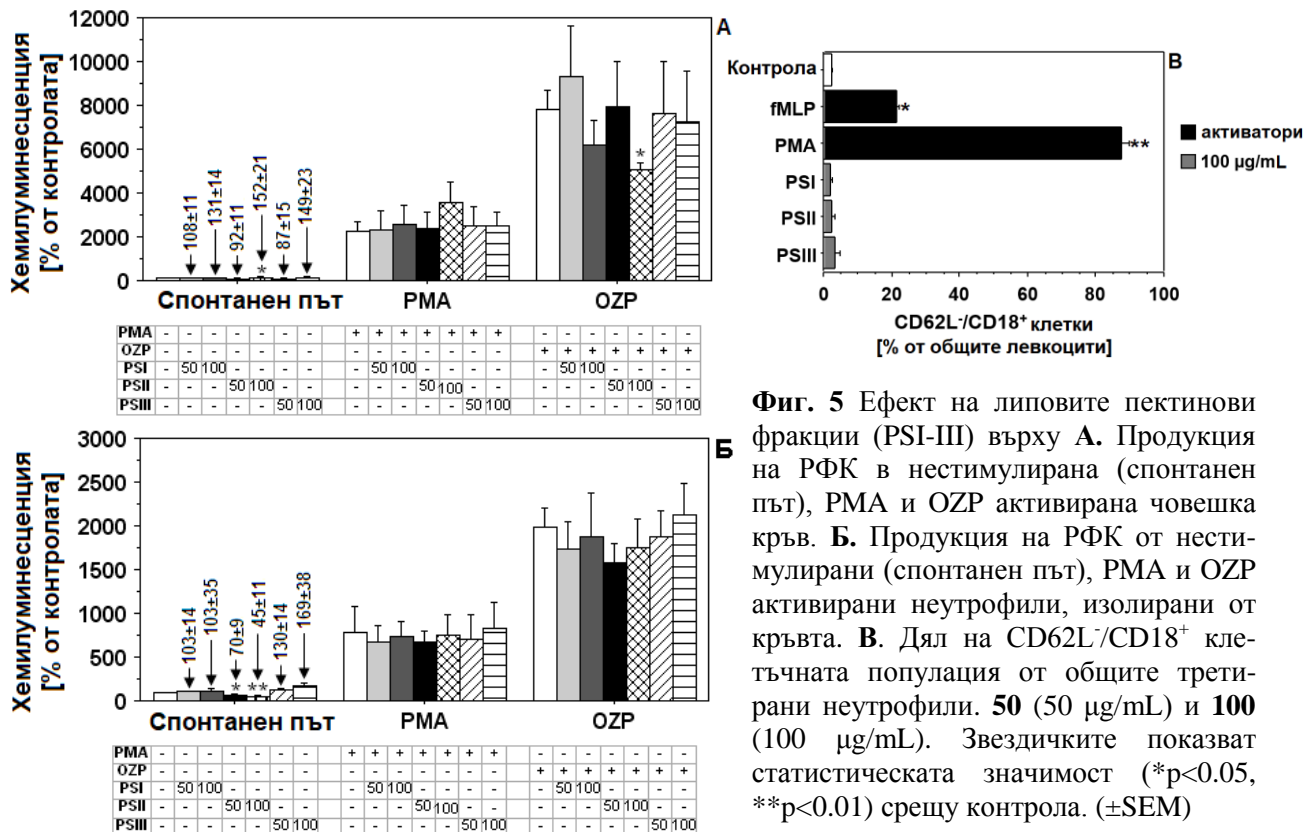
### 3.2.1. Комплемент-фиксираща активност

Трите липови пектинови фракции бяха изследвани за ефекта им върху инхибирането на хемолизата на човешкия комплемент върху прицелни овчи еритроцити *in vitro*. PSI прояви най-високата комплемент-фиксираща активност с  $\text{IC}_{50} = 154.5 \mu\text{g/mL}$ . PSII и PSIII проявиха пониска активност, като  $\text{IC}_{50}$  на PSIII беше  $491.6 \mu\text{g/mL}$ . Най-вероятно по-високата активност на PSI е свързана с наличието на АГ-II структури, които са активни върху човешкия комплемент (Yamada & Kiyohara, 2007). За сравнение,  $\text{IC}_{50}$  стойността на липа ПЗСК по КП, но при използване на свински (а не човешки) серум беше  $2173.3 \mu\text{g/mL}$ . Независимо от разликата в произхода на

използвания серум при двата анализа ясно може да се каже, че пектиновите ПЗ в липа ПЗСК са способни да проявят антикомплементарна активност.

### 3.2.2. Фагоцитен имуен отговор

#### 3.2.2.1. Човешка кръв и изолирани неутрофили

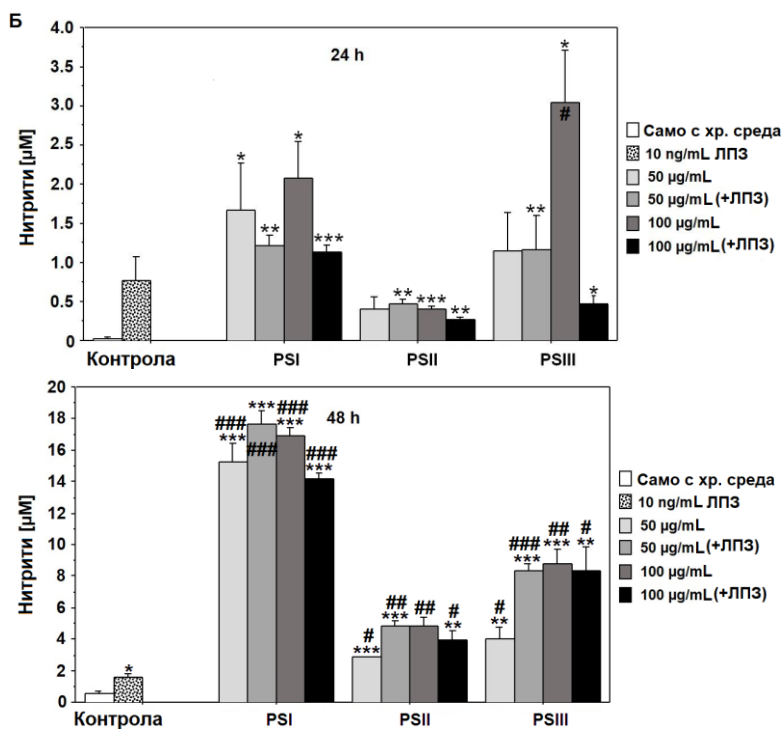


Трите фракции повишиха продукцията на РФК в човешка кръв при 100 µg/mL, като само PSIII повиши ХЛ-та при третиране на изолираните от кръвта неутрофили (фиг. 5А и Б). Това означава, че пектините са поне частично отговорни за повишението в продукцията на РФК в човешка кръв, както и за стимулирането на CD14<sup>+</sup>, CD64<sup>+</sup> клетките и ИЛ-6 продукцията от липа ПЗК. При условие на костимулиране с OZP, PSI и PSII ясно потиснаха продукцията на РФК в кръвта при по-високата концентрация от 100 µg/mL, в сравнение с контролата от самостоятелното стимулиране с OZP (фиг. 5А). Следователно беше предположено както за лавандуловите пектини, че тези от липата също могат да проявят противовъзпалителна активност на основата на своите комплемент-фиксиращи свойства. За сравнение липовият ПЗК повиши спонтанната продукция на РФК в човешка кръв, както и ХЛ-ят сигнал при костимулиране с OZP, но не и с PMA (Глава 3). При изследване на ефекта на ПЗ-те фракции върху експресията на β<sub>2</sub>-интегрин (CD18) и L-селектина (CD62L) върху изолираните неутрофили само PSIII показва слаба активност върху експресията на CD18 (фиг. 5Б). Това е в съответствие с резултатите от спонтанната продукция на РФК в човешка кръв и изолираните от нея неутрофили. Следователно беше предположено, че уникалната глюкуронидирана РГ-I структура на PSIII може да участва в наблюдаваните ефекти.

#### 3.2.2.2. Миши макрофаги

Пречистените липови пектини не бяха токсични за макрофагите (не е показано). След 48 h, PSI предизвика 2 пъти по-високо производство на NO от PSIII (p<0.001), което можеше да бъде обяснено с различните структурни особености на двете проби (фиг. 6). Стимулиращата активност на PSII върху макрофагите изглеждаше по-слаба от тази на PSI и PSIII. Въпреки това при изследване на комбинаторния ефект на фракциите с ЛПЗ-те върху продукцията на NO беше открита по-ниска продукция при всички пектини (100 µg/mL), в сравнение с тази при самостоятелното третиране с отделните ПЗ-ни фракции. Този ефект беше в съответствие с

iNOS експресията след 24 h и 48 h на макрофаговото стимулиране. Липовите пектини проявяват и противовъзпалително действие в присъствие на ЛПЗ по подобие на лавандуловите ПЗ. Всъщност, *T. tomentosa* е известна със своето противовъзпалително действие, отнесено основно към нейните флавоноиди, но вероятно ПЗ-те също допринасят за този ефект (Matsuda et al., 2002).



**Фиг. 6** Продукция на NO ( $\pm$ SEM) от RAW 264.7 клетки, култивирани самостоятелно с PSI, II и III или в комбинация с ЛПЗ от *E. coli* (+ контрола). Звездичките показват статистическата значимост (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) срещу контрола (само с хр. среда) или (# $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ ) срещу ЛПЗ.

Обикновено имунните клетки могат да бъдат активирани от сложните пектини, за разлика от туморните клетки и вероятно, и FL клетките.

В тази работа се показва за първи път, че ацетиленият и силно глюкуронидиран РГ-I може да прояви имуномодулиращи свойства чрез активирането на макрофаги и неутрофили, и чрез потискане жизнеспособността на туморни клетки. На основата на получените резултати се заключава, че пектините в цветовете на *T. tomentosa* са биологично и имунологично активни съединения. Пектините от сребролистна липа заслужават да бъдат включени в изследванията върху съпътстващите терапии за превенция и третиране на заболявания свързани с имунната система като възпалителните заболявания.

## Глава 6

### Сравнително изследване на структурата и имуномодулиращата активност на водно-екстрахируемите полизахариди от листата и корените на обикновената коприва (*Urtica dioica* L.)

#### Резюме

В настоящата глава са сравнени структурата и имуномодулиращата активност на хроматографски пречистени, водно-екстрахируеми ПЗ от листата (NL-PSI) и корените (NR-PSI-IV) на *Urtica dioica* L. NL-PSI ( $M_w = 323.6$  kDa) е пектинов ПЗ със CM= 7% и CA= 7.9%, изграден от голям ХГ-ов регион (52.7%) и РГ-I област (39.7%), чиито Rha звена са значително заместени при O-4 (58%) най-вероятно с откритите 1,5- и 1,3,5-арабинанови (34% от Ara) и АГ-

#### 3.2.3. Интестинална

##### имуномодулираща активност

За съжаление, само PSI показва слаба активност ( $p < 0.01$ ), а PSII и PSIII бяха неактивни (не е показано). Следователно другите ПЗ-ни фракции (вж. Глава 2), които не бяха подложени на последващо пречистване и анализ, наред с (или) нискомолекулните съединения са били отговорни за активността на липовия ПЗК (вж. Глава 1).

#### 3.3. Антитуморна активност

Подобно на липа ПЗК, PSI и PSIII показаха неспецифично антипролиферативно действие спрямо туморните (вж. в дисертацията) и нормалните амниотични клетки (не е показано). PSII не беше анализирана, поради ограниченият ѝ добив. Разликата между ПЗ-ния ефект върху FL клетките и изследваните имунни клетки (важи за Глави 4-6) може да бъде обяснено основно с техните различни функции в организма.

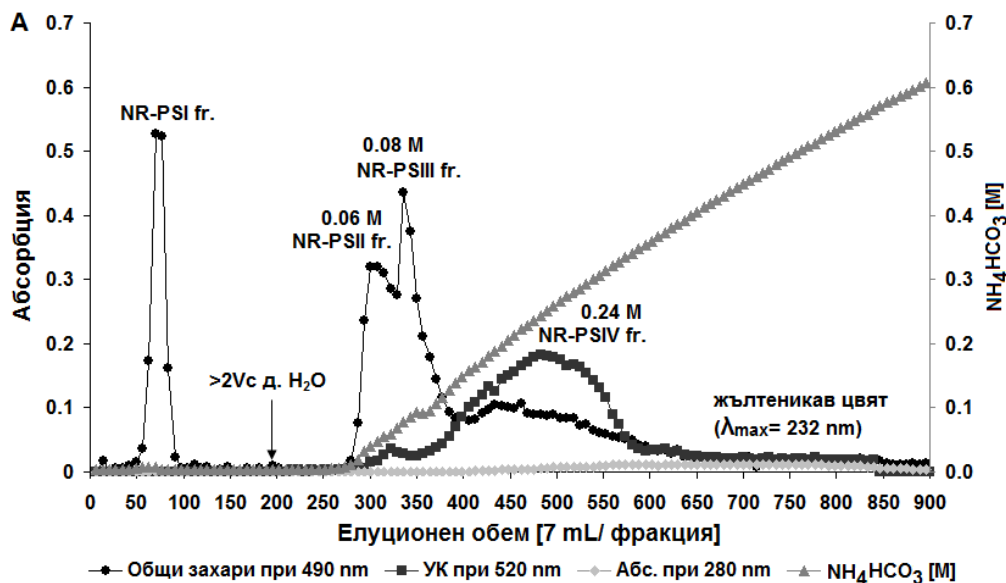
II структури, имащи 44% 3,6-галактани и 25% T-Gal. NR-PSI ( $M_w= 12.6$  kDa) и II ( $M_w= 24.1$  kDa) са неутрални ПЗ, съдържащи над 91% Glc, а NR-PSIII ( $M_w= 21.0$  kDa) съдържа около 82% Glc и примеси от пектинови и други ПЗ. NR-PSIV ( $M_w= 12.2$  kDa) е пектинов ПЗ със CM= 6.3% и CA= 18.1%, съставен от по-малък ХГ-ов фрагмент (29.3%) и основен РГ-I домейн (43.2%), чийто Rha звена са 27% O-4 гликозилирани най-вероятно с детектираните 1,5- и 1,3,5-арабинанови (24% от Ara) и АГ-II структури, съдържащи 22% 3,6-галактани и 40% T-Gal. ПЗ-те показаха противовъзпалителен потенциал при 100  $\mu\text{g/mL}$  чрез *ex vivo* потискане продукцията на OZP активираната продукция на РФК в човешка кръв и *in vitro* инхибиране на ЛПЗ индуцираната iNOS експресия, и биосинтез на NO от миши макрофаги. NR-PSIV прояви най-високата имуностимулираща активност върху спонтанния синтез на РФК и NO от неутрофили и макрофаги, съответно, както и най-високата *ex vivo* интестинална имуностимулираща активност. Тя потисна селективно и *in vitro* пролиферацията на A549 туморни клетки при 50  $\mu\text{g/mL}$  с около 32% след 48 h. Следователно не само  $\alpha$ -глюканите, но и пектините в корените, както и неизследваните пектини в листата допринасят за противовъзпалителната активност на копривата.

Целта на настоящата глава е да се сравни химичният състав, структурата, имуномодулиращата активност и в частност противовъзпалителния потенциал на водно-екстрахируемите ПЗ от листата и корените на копривата.

### 3. Резултати и дискусия

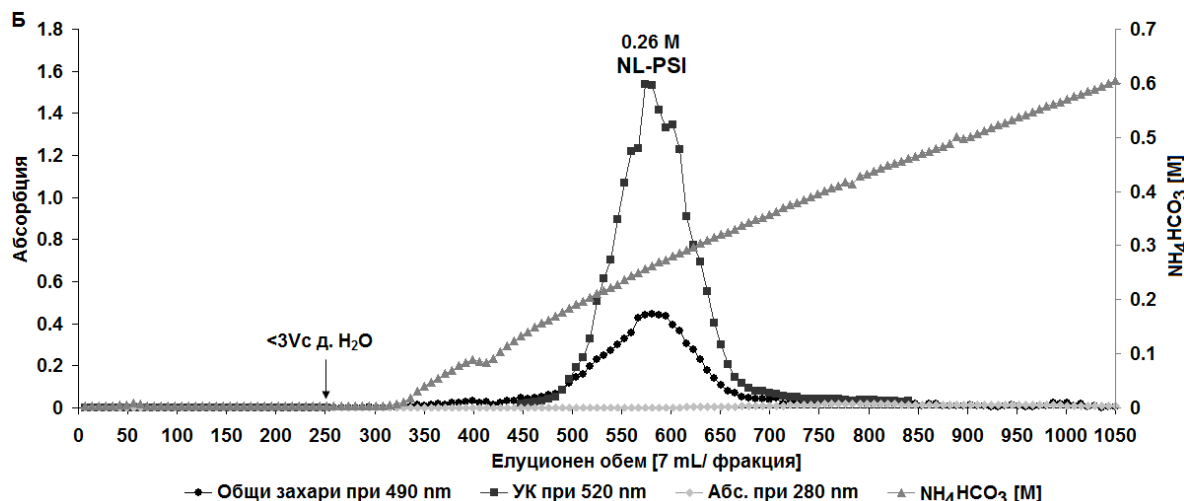
#### 3.1. Пречистване и структурна характеристика на копривените полизахаридни фракции

##### 3.1.1. Пречистване и монозахариден състав



**Фиг. 1.** Пречистване и фракциониране на водно-екстрахируемите полизахариди от корените на обикновената коприва (*Urtica dioica* L.) чрез анионообменна хроматография при стационарна фаза DEAE-Sepharose Fast Flow (50×1.5 cm).  $V_c=87$  mL, УК (уронови киселини).

ПЗ-те от корените са частично изследвани (Wagner et al., 1989; Zhang et al., 2013). Коприва-корен ПЗСК беше подложен на хроматографско пречистване и разделяне чрез АОХ с цел разделяне на киселите от неутралните ПЗ. Разделянето беше проведено чрез градиентно елуиране (1 mL/min) с 0-1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (фиг. 1), като бяха получени условно 4 фракции. NR-PSI, II и III са типичните глюкани, съдържащи незначителни по количество примеси от други ПЗ (табл. 1). NR-PSIV представлява пектинов ПЗ с високо съдържание на АГ-ви структури (АГ-II). Като по-голямата част от молекулата е изградена от разклонените РГ-I региони, богати на неутрални захари. Освен това фракцията съдържа високо количество Glc (15.7%), която вероятно е свързана в независим глюканов полимер (нишесте и др.). Елуирането на протеините в NR-PSIV чрез EPX на Sepharyl S-200 започна заедно с ПЗ-те около  $V_0$ , което подсказва, че те може да са ковалентно свързани с ПЗ-те (не е показано).



**Фиг. 2.** Пречистване и фракциониране на водно-екстрахируемите полизахариди от листата на обикновената коприва (*Urtica dioica* L.) чрез анионобменна хроматография (вж. **фиг. 1**).

**Таблица 1.** Добив и химична характеристика на копривените полизахаридни фракции.

	NL-PSI	NR-PSI	NR-PSII	NR-PSIII	NR-PSIV
Добив [% от Коприва ПЗСК]	43.1(a)	10.2	10.3	13.8	28.4
Добив [% от изходен материал]	1.8	0.33	0.34	0.5	0.9
Общи захари [%]	68.2	66.7	97.8	91.9	46.4
АУС [%]	39.1	н.а.	н.а.	4.3	15.4
СМ(б) [mol%] (CH <sub>3</sub> O съдърж. [%])	17.0 (1.2)	н.а.	н.а.	н.а.	6.3 (0.2)
СА(б) [mol%] (CH <sub>3</sub> CO съдърж. [%])	7.9 (0.8)	н.а.	н.а.	н.а.	18.1 (0.7)
Белтъчно съдържание [%]	1.3	н.н.	н.н.	0.2	10.5
Общи феноли [%]	0.4	н.н.	н.н.	н.н.	1.3
ЛПЗ [%]	н.н.	н.н.	н.н.	н.н.	0.17
Монозахариден състав					
Ara	8.3(в)(10.2) (г)	н.н.	1.4 (1.7)	3.5 (4.1)	8.7 (10.4)
Rha	9.3 (10.4)	н.н.	0.9 (1.0)	1.4 (1.5)	8.9 (9.8)
Fuc	1.2 (1.3)	н.н.	0.2 (0.2)	0.4 (0.4)	1.8 (2.0)
Xyl	0.7 (0.9)	н.н.	1.1 (1.3)	1.9 (2.3)	1.3 (1.6)
Man	0.2 (0.2)	2.3 (2.3)	2.1 (2.1)	2.8 (2.8)	4.6 (4.6)
Gal	12.8 (13.1)	2.8 (2.8)	2.9 (2.9)	6.5 (6.4)	16.7 (16.7)
Glc	2.5 (2.5)	94.9 (94.9)	91.4 (90.8)	81.6 (80.6)	15.7 (15.7)
GlcA	2.9 (2.7)	н.н.	н.н.	0.7 (0.6)	4.2 (3.9)
GalA	62.0 (58.7)	н.н.	н.н.	1.3 (1.2)	38.2 (35.4)
Kdo	++	н.а.	н.а.	н.а.	++
AGII	+++	н.н.	+	++	++
Молекулна маса [Da]	4.53×10 <sup>5</sup> (9.6%) 7.56×10 <sup>4</sup> (11.7%) 1.41×10 <sup>4</sup> (78.7%)	1.26×10 <sup>4</sup>	2.52×10 <sup>4</sup> (77.9%) 0.52×10 <sup>4</sup> (22.1%)	2.10×10 <sup>4</sup>	1.22×10 <sup>4</sup>
M <sub>w</sub> (д)	32.36×10 <sup>4</sup>		2.41×10 <sup>4</sup>		

(а)Коприва листа ПЗСК; (б)изчислено на база АУС, moles метанол или оцетна киселина за 100 moles GalA; (в)w/w%, изчислено на основата на общото въглехидратно съдържание; (г)mol% от общото въглехидратно съдържание; (д)средна молекулна маса; **н.а.** – не е анализирано; **н.н.** – не е намерено.

След предварителното третиране на коприва-лист ПЗСК с етанол, получената проба ПЗК2 беше подложена на пречистване и разделяне чрез АОХ при градиентно елуиране (1 mL/min) с 0-1 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (фиг. 2). При това беше получена условно 1 фракция (NL-PSI). NL-PSI представлява типичен пектинов ПЗ с преимуществен ХГ-ов регион и ясно застъпен РГ-I с АГ-II структури. Само в NR-PSIV бяха детектирани ЛПЗ в количество 0,17%. С помощта на молекулярно-биологичния тест PyroGene™ rFC, в който е изключена интерференцията от растителните глюкани беше определено, че NR-PSIV съдържа 0.97±0.05 EU/mL ЛПЗ.

### 3.1.2. GC-MS анализ на гликозидните връзки

**Таблица 2.** GC-MS анализ на гликозидните връзки в избрани копривени полизахаридни фракции.

Гликозидни връзки	NL-PSI	NR-PSIV
T-Araf	5.1 (6.3)	6.0(a) (7.2)(б)
1,2-Araf	следи	0.3 (0.4)
1,3-Araf	0.5 (0.6)	0.3 (0.3)
1,5-Araf	2.2 (2.6)	1.8 (2.1)
1,3,5-Araf	0.6 (0.7)	0.3 (0.4)
T-Rhap	н.н.	3.2 (3.6)
1,2-Rhap	2.3 (2.6)	2.7 (3.0)
1,2,4-Rhap	5.4 (6.0)	2.4 (2.6)
1,2,3-Rhap	н.н.	0.5 (0.6)
1,3,4-Rhap	1.6 (1.8)	н.н.
T-Fucp	н.н.	1.8 (2.0)
T-Xylp	0.4 (0.6)	н.н.
1,3-Xylp	0.3 (0.3)	н.н.
1,4-Xylp	н.н.	1.3 (1.6)
1,2-Manp	н.н.	следи
1,2,4-Manp	следи	н.н.
1,3-Manp	н.н.	следи
T-Galp	3.2 (3.3)	6.7 (6.7)
T-Galf	н.н.	0.6 (0.6)
1,4-Galp	н.н.	1.2 (1.2)
1,3-Galp	2.5 (2.6)	2.0 (2.0)
1,6-Galp	1.4 (1.5)	2.5 (2.5)
1,3,6-Galp	5.6 (5.8)	3.7 (3.7)
T-Glcp	н.н.	2.1 (2.1)
1,4-Glcp	1.2 (1.2)	11.4 (11.4)
1,2,4-Glcp	1.3 (1.3)	н.н.
1,6-Glcp	н.н.	2.2 (2.2)
T-GlcpA	2.0 (1.9)	2.7 (2.5)
1,4-GlcpA	0.9 (0.8)	1.5 (1.4)
T-GalpA	4.8 (4.5)	10.2 (9.4)
1,4-GalpA	51.8 (49)	24.2 (22.4)
1,3,4-GalpA	5.4 (5.1)	3.8 (3.6)

(a)w/w% на база общо въглехидратно съдържание; (б)mol% от общото въглехидратно съдържание. н.н. – не е намерено.

Резултатите от метилизационния анализ потвърждават, че NL-PSI и NR-PSIV са типични пектинови ПЗ с характерните ХГ-ов фрагмент и РГ-I скелетна структура, представени от 1,4-свързаната GalpA и 1,2,(4)-Rhap единици (табл. 2). В двете фракции присъстват 1,3,6-Galp единици, представляващи скелетната структура на имунологично активния АГ-II, като в NR-PSIV се намира и 1,4-Galp, свързвана с АГ-I. NL-PSI има най-голям дял на 1,4-GalpA (51.8%), което се очакваше, имайки предвид високото съдържание на GalA във фракцията. За сравнение при NR-PSIV, 1,4-GalpA е само 24.2% от пробата, като прави впечатление относително големият дял на T-GalpA (10.2%). Моларното съотношение на 1,2:1,2,4:1,3,4-Rhap в NL-PSI е 25:58:17, откъдето може да се види, че делът на 1,2,4-Rhap е 58% от наличната Rha в пробата. Това показва високата степен на заместване на Rha при O-4 със странични вериги от неутрални захари (Ara, Gal и особено АГ-II). Допълнително 1,3,4-заместването при Rhap е 17% от наличната Rha в тази фракция, като тези остатъци са свързани най-вероятно в РГ-II (Schols & Voragen, 2002). При NR-PSIV моларното съотношение T:1,2:1,2,4:1,2,3-Rhap е 36.7:30.6:26.5:6.1, при което се показва, че делът на 1,2,4-Rhap е 27% или по-малък от този

при NL-PSI. Аналогично, моларното съотношение на T:1,3:1,6:1,3,6-Galp в NL-PSI е 25:20:11:44, откъдето ясно се вижда, че Gal е свързана предимно в 3,6-галактановите структури на АГ-II. При NR-PSIV съотношението Tr:Tf:1,3:1,4:1,6:1,3,6-Galp е 40:4:7:12:15:22, при което може да се каже, че 3,6-галактаните заемат 22% от Gal в пробата. В тази фракция е по-високо съдържанието на T-Gal и 1,6-Galp от това в NL-PSI, което вероятно е свързано с по-високото съдържание на Gal при фракцията от корените. Тези резултати са в съгласие с данните от теста на Ярив за двете фракции. При NR-PSIV е намерена рядко срещаната в природата Galf. При Ara най-голям дял заема T-Araf и в двете проби, което свидетелства за нейното разположение предимно в периферията на страничните вериги, както се наблюдава при АГ-те. Двете фракции

се различават най-вече по съдържанието на 1,3,5-, 1,3- и 1,2-Аraf. Сумата 1,3,5- + 1,5-Аraf може да ни ориентира за съдържанието на арабинани (Schols & Voragen, 2002) във фракциите, като 34% и 24% от Ara в NL-PSI и NR-PSIV са свързани в подобни структури. GlcA е Т- и 1,4-свързана в двете фракции най-вероятно в страничните вериги на РГ-I (при АГ-II) и -II (Yamada & Kiyohara, 2007). Glc в NR-PSIV е основно 1,4-свързана, като съществува и Т-, и 1,6-свързани остатъци, което показва, че във фракцията глюкозаните са по-скоро от нишестен тип. В NL-PSI Glc е поделена почти по равно в остатъци с 1,2 и 1,2,4-връзки. От данните в **табл. 1** и по формулите на Denman & Morris (2015), ХГ-ът (%) в NL-PSI и NR-PSIV е 52.7% и 29.3%, а РГ-I (%) е 39.7% и 43.2%, съответно.

### 3.1.3. ЯМР анализ на полизахаридна фракция NR-PSIV

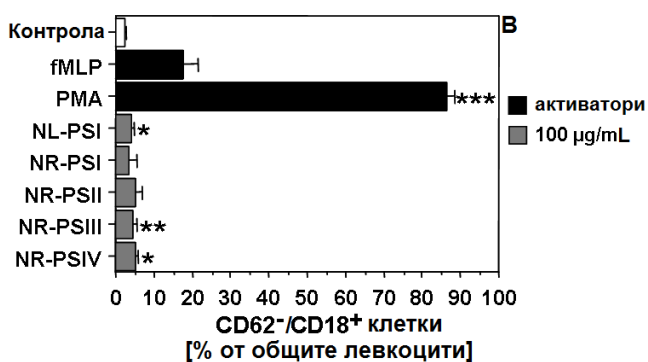
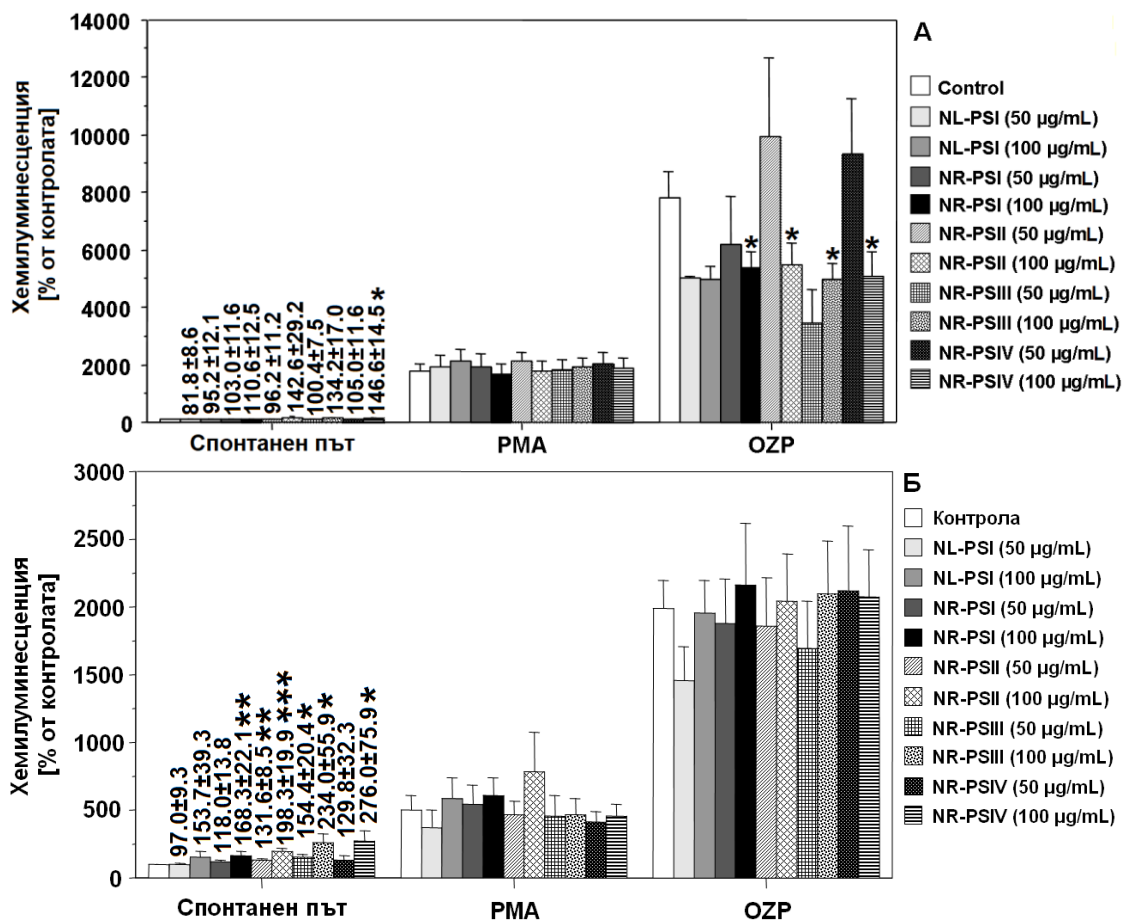
NR-PSIV беше избрана за последващо структурно изследване чрез високоразделителен двумерен ЯМР, тъй като тази фракция показва най-мощната имуномодулираща активност в последващите анализи. Идентифицирането на структурните фрагменти в NR-PSIV беше направено чрез намерените специфични корелации в HSQC спектъра, в комбинация с тези в COSY (TOCSY), ROESY, и HMBC (най-вече за C) спектрите (не е показано). Разчитането на ЯМР резултатите беше направено с помощта на литературни данни и в съответствие с монозахаридния състав, и състава на гликозидните връзки (Shakhmatov et al., 2015; 2016). С ЯМР изследването се потвърди, че NR-PSIV съдържа пектинови ПЗ с по-малък ХГ-ов фрагмент и преимуществен РГ-I регион, съдържащ характерните за АГ-II - 1,6-галактани и за арабинаните - 1,5- $\alpha$ -L-Araf остатъци. Допълнително беше установено наличието на метилови и ацетилови естери в ПЗ-те, и присъствието на различни крайни  $\beta$ -D-Galp остатъци. Последното е в съответствие с резултатите от анализа на гликозидните връзки и то отразява някои специфични структурни особености на страничните вериги в РГ-I на NR-PSIV, характеризиращи се с доста Т-Galp.

## 3.2. Имуномодулиращ ефект

### 3.2.1. Ефект върху фагоцитни левкоцити

#### 3.2.1.1. Продукция на РФК в човешка кръв и изолирани неутрофили

При изследване ефекта на изходните ПЗСК-и от коприва (лист) и коприва (корен) върху продукцията на РФК в човешка кръв беше установено, че коприва (корен) ПЗСК стимулира спонтанната продукция на РФК от неутрофилите в кръвта при 100 ( $619\% \pm 105$ ) и 10 ( $302\% \pm 70$ )  $\mu\text{g/mL}$ . Активността на коприва (лист) ПЗСК беше незначителна, но по-висока ( $117\% \pm 11$ ) при 10 пъти по-ниската концентрация (10  $\mu\text{g/mL}$ ), което показва, че полифенолите в пробата пречат с антиоксидантното си действие на определянето на активността. От получените данни след пречистването се потвърди, че ПЗ-те в изходните комплекси от листата и корените са частично отговорни за наблюдаваната продукция на РФК в третираната с комплексите кръв (**фиг. 3**). При ПЗ-те от корените се видя, че с приближаването към пектиновата фракция активността по спонтанния път нараства и макар, и не много големите разлики стимулиращият ефект беше най-голям при NR-PSIV (**фиг. 3Б**). При костимулирането на човешка кръв с пречистените ПЗ (100  $\mu\text{g/mL}$ ) и OZP се понижи продукцията на РФК (**фиг. 3А**). Подобен ефект не беше наблюдаван с коприва (корен) ПЗСК. Това показва, че копривените ПЗ притежават противовъзпалителен потенциал. Активността на ПЗ-те фракции беше по-висока при 100  $\mu\text{g/mL}$  по спонтанния път с изолираните неутрофили (**фиг. 3Б**). ПЗ-те повлияха слабо експресията на CD18 (**фиг. 3В**) и това им действие също потвърди тяхната роля в стимулиране продукцията на РФК от коприва (лист) и коприва (корен) ПЗСК. Въпреки високата концентрация на ЛПЗ в NR-PSIV нейният ефект върху CD18 експресията не се различаваше от този на другите фракции, а е известно, че ЛПЗ-те индуцират експресията на CD18 (Lynn et al., 1991).

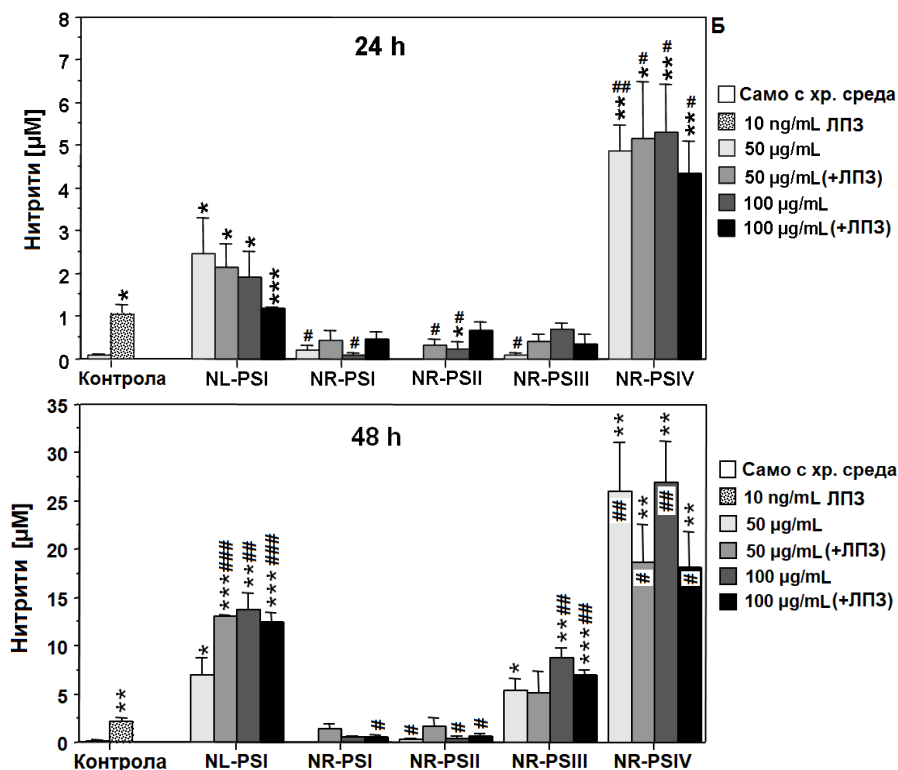


**Фиг. 3** Ефект на полизахаридните фракции от листата (NL-PSI) и корените на коприва (NR-PSI-IV) върху А. Продукцията на РФК в нестимулирана (спонтанен път), PMA и OZP активирана човешка кръв. Б. Продукцията на РФК от нестимулирани (спонтанен път), PMA и OZP активирани неутрофили, изолирани от кръвта. В. Дял на CD62L<sup>+</sup>/CD18<sup>+</sup> клетъчната популация от общите третирани неутрофили. Звездичките показват статистическата значимост (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001) срещу контрола (нетретирана/и кръв/клетки). (±SEM)

### 3.2.1.2. Продукция на азотен оксид от миши макрофаги

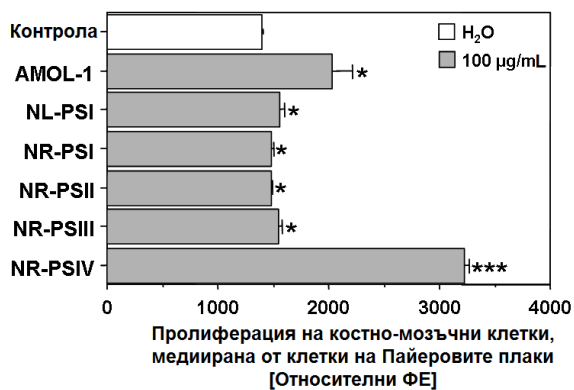
Само пектин-съдържащите фракции стимулираха продукцията на NO (фиг. 4). Продукцията на NO на глюкановите ПЗ и при комбинирането с ЛПЗ-те беше по-ниска от тази на самите ЛПЗ, но същевременно те също индуцираха iNOS експресията (не е показано). Вероятно техният механизъм на действие върху макрофагите се различава от този на пектините. Изследваните глюкани просто може да не притежават двойственият начин на действие на пектините, които в отсъствие на ЛПЗ стимулират NO продукцията, а в присъствие на ЛПЗ предизвикват понижаване на NO синтеза (вж. Глави 4 и 5). От получените резултати се вижда, че копривените пектини също притежават противовъзпалителен потенциал срещу ЛПЗ-те от *E. coli*. Пониженият синтез на NO при комбинирането на NR-PSIV с ЛПЗ от *E. coli* и слабият и индукционен ефект върху експресията на CD18 са в съответствие с резултатите от RyoGene™ rFC теста. Най-вероятно ЛПЗ-те в коприва (корен) ПЗСК са попаднали от почвените бактерии, чиито ЛПЗ имат доста често различна (и по-ниска) активност от тази на клиничните щамове на *E. coli* (Ataee et al., 2012). Копривените ПЗ не бяха токсични за макрофагите (не е показано).





**Фиг. 4** *In vitro* ефект на полизахаридните фракции от листата (NL-PSI) и корените на копривата (NR-PSI-IV) върху продукцията на NO от миши макрофаги, култивирани самостоятелно или в комбинация с ЛПЗ. Звездичките показват статистическата значимост (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) срещу контрола от нетретирани клетки (само с хр. среда) и (# $p < 0.05$ , ## $p < 0.05$ , ### $p < 0.001$ ) срещу ЛПЗ. ( $\pm$ SEM)

и то в по-големи количества от тези в NR-PSIV. Частично обяснение за по-високата активност на NR-PSIV по отношение на въглехидратното съдържание може да се търси тъй като тази фракция има почти два пъти по-голямо количество на 1,6-Galp в АГ-II и 2 пъти по-голямо количество T-Galp (табл. 2). Имайки предвид активността на NR-PSI-III, Glc едва ли е от съществено значение в проявлението на активността в този случай.



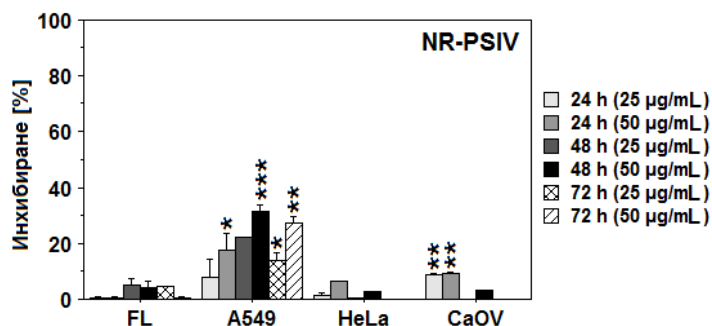
**Фиг. 5** *Ex vivo* интестинална имуномодулираща активност ( $\pm$ SEM). Повишение в продукцията на костно-мозъчни пролиферативни цитокини от клетки на Пайеровите плаки, култивирани в присъствие или отсъствие на полизахаридните фракции от листата (NL-PSI) и корените на коприва (NR-PSI-IV). Символите показват статистическата значимост (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) срещу (-) контрола (H<sub>2</sub>O). AMOL-1 е (+) контрола. ФЕ (флуоресцентни единици).

### 3.3. *In vitro* антитуморна активност

На **фиг. 6** са представени предварителните резултати при тестването на NR-PSIV само с клетъчните линии, при които беше постигнат антипролиферативен ефект. NL-PSI и NR-PSII не показаха специфичност на антитуморното действие, а при NR-PSIII то беше слабо изразено. NR-PSI не беше включена в изследването поради липсата на достатъчни количества от нея. NR-PSIV повлия най-слабо пролиферацията на нормалните FL клетки, което показва, че при тази фракция може да се говори за известна специфичност на антитуморното действие. След 48 h или 72 h на третиране с 50 µg/mL NR-PSIV бяха постигнати 31.7% $\pm$ 2.0 или 27.2% $\pm$ 2.5 инхибиране на пролиферацията на белодробните аденокарциномни клетки.

### 3.2.2. Интестинална имуномодулираща активност

От представените резултати на **фиг. 5** се вижда, че с най-висока и статистически значима интестинална имуномодулираща активност се открие NR-PSIV, чийто ефект не може да бъде свързан със замърсяването с ЛПЗ. Нейната активност беше по-висока от тази на положителната контрола. Резултатите показват ясното преимущество на пектините в проявлението на тази активност пред неутралните глюкози в коприва (корен) ПЗСК, който беше най-активният от всички 42 изследвани комплекса (Глава 1). Ефектът на NL-PSI беше по-слаб, въпреки че фракцията съдържа необходимите за проявлението на активността АГ-II структури



**Фиг. 6** *In vitro* потискащ ефект на NR-PSIV върху **FL** (нормални амниотични клетки), **A549** (белодробен аденокарцином), **HeLa** (аденокарцином на яйчниците) и **CaOV** (цистаденокарцином на тестисите) клетки. Звездичките показват статистическата значимост (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) срещу контрола (**FL**). ( $\pm$ SEM)

За ПЗ-те от корените на копривата, с основен акцент върху  $\alpha$ -глюканите, е документирано, че притежават противовъзпалителен потенциал (Wagner et al. 1989; Wagner & Kraus, 2000). Същевременно ние установихме, че пектините от корените също притежават не по-малък по значение противовъзпалителен потенциал. За разлика от глюканите, те проявиха и имуностимулиращо действие, както и висока интестинална имуномодулираща активност. За листата на копривата липсва всякаква информация за водно-разтворимите ПЗ и тяхното действие се ограничава само до нискомолекулните съединения (Carvalho et al., 2017). Нашите изследвания показват, че пектините в листата спадат към имунологично активните вещества с противовъзпалително и имуностимулиращо действие. За ПЗ-ния комплекс от корените на копривата е установено, че притежава противоракова активност (Lichius et al., 1999). Понеже NR-PSIV показва специфичност на антитуморното действие беше предположено, че по-скоро пектините са отговорни за проявлението на антитуморната активност от ПЗ-ния комплекс от корените, като тази активност може да бъде свързана с техния имуностимулиращ ефект.

## V. ОБОБЩЕНИЕ

### 1. Структурни особености на изучаваните билкови полизахариди

По-долу са показани най-важните данни от химичната характеристика на пречистените ПЗ-ни фракции със специален акцент върху наличието на потенциалните имунологично активни разклонени вериги при РГ-I (1,2,4-Rhap) от арабинанови и АГ-II структури [1,(3),5-Araf и 1,(3),6,-Galp].

#### Лавандулов цвят (chPS-L1 и chPS-L2, chPP-L – полифенолна фракция)

**chPS-L1:** Добив=0.9% (суха суровина), АУС=40.8%, CM=63.4mol%, CA=16.8mol% (O-3Ac=11.6mol%; O-2Ac=5.2mol%), Mw=52.4 kDa, ХГ=47.6mol%, РГ-I=39.1mol%, АГ-II: +++++.

**1,4-GalpA=47.3mol%; 1,2,4-Rhap=2.6mol%** (42.0mol% от Rha); 1,3,6-Galp=6.9mol% (47.6mol% от Gal); **1,6-Galp=2.2mol%** (15.2mol% от Gal); **T-Galp=3.4mol%** (23.4mol% от Gal); 1,5-Araf=3.3mol% (27.0mol% от Ara); 1,3,5-Araf=1.5mol% (12.3mol% от Ara); T-Araf=5.6mol% (45.9mol% от Ara).

#### Липов цвят (PSI, PSII и PSIII)

**PSI:** Добив=0.6%, АУС=46.8%, CM=13.1mol%, CA=5.5mol%, Mw=28.2 kDa, ХГ=52.0mol%, РГ-I=40.6mol%, АГ-II: +.

**1,4-GalpA=56.2mol%; 1,2,4-Rhap=1.6mol%** (13mol% от Rha); 1,3,6-Galp=2.2mol% (32.4mol% от Gal); **1,6-Galp=1.1mol%** (16.2mol% от Gal); **T-Galp=2.6mol%** (38.2% от Gal); 1,5-Araf=3.6mol% (39.1mol% от Ara); 1,3,5-Araf=1.0mol% (10.9mol% от Ara); T-Araf=4.2mol% (45.7mol% от Ara).

**PSIII:** Добив=0.5%, АУС=39.9%, CM=0mol%, CA=32.0mol% при O-3 на Rha (ЯМР), Mw=382 kDa, ХГ=2.0%, РГ-I=94.5%.

**1,4-GalpA=1.8%; 1,3,4-GalpA=30.0%; 1,2,4-Rhap=-0%; 1,2-Rhap=29.8%; T-GlcpA=29.6%.**

#### Коприва (лист) (NL-PSI)

**NL-PSI:** Добив=1.8%, АУС=39.1%, CM=17.0mol%, CA=7.9mol%, Mw=323.6 kDa, ХГ=48.3mol%, РГ-I=44.1mol%, АГ-II: +++++.

**1,4-GalpA=49.0mol%; 1,2,4-Rhap=6.0mol%** (57.7mol% от Rha); 1,3,6-Galp=5.8mol% (44.3mol% от Gal); **1,6-Galp=1.5mol%** (11.5mol% Gal); **T-Galp=3.3mol%** (25.2mol% от Gal); 1,5-



между аномерните сигнали на Gal и H4 на 1,2,4-Rhap. От получените данни обаче не може да бъде казано ясно какъв дял от 1,3,6-Galp е O-3 заместен с Gal или Ara, въпреки детектирането чрез ЯМР (комбинация от COSY и ROESY) на 3,6-галактаните.

## 2. Сравнително разглеждане на имуномодулиращото действие на изучаваните билкови полизахариди и техните изходни комплекси

ПЗСК-и от коприва, липа и лавандула могат да бъдат подредени по своята активност, както следва:

*In vitro* комплемент-фиксираща активност по алтернативния път

**Коприва-корен** ( $IC_{50}=21.1 \mu\text{g/mL}$ )>**Коприва-лист**>**Липа**=**Лавандула** ( $IC_{50}=77 \mu\text{g/mL}$ )

*Ex vivo* интестинална имуномодулираща активност (пролиферация на костно-мозъчни клетки, медирана от клетки на чревните ПП) ( $100 \mu\text{g/mL}$ )

**Коприва-корен**>**АМОЛ-1\***>**Коприва-лист**>**Липа**>**Лавандула**

\*активен пектинов ПЗ, съдържащ АГ-II, използван като положителна контрола.

*Ex vivo* продукция на IL-6 от имунокомпетентни клетки на ПП ( $100 \mu\text{g/mL}$ )

**Коприва-корен**>**АМОЛ-1**>**Липа**>**Лавандула**>**Коприва-лист**

*Ex vivo* стимулиране продукцията на РФК в човешка кръв ( $10 \mu\text{g/mL}$ )

**Коприва-корен**>**Липа**>**Лавандула\***>**Коприва-лист\***

\*при  $100 \mu\text{g/mL}$  проявяват по-ниска активност, заради антиоксидантното си действие.

*Ex vivo* потискане активираната с OZP или РМА продукция на РФК в човешка кръв (противовъзпалителен потенциал) ( $100 \mu\text{g/mL}$ )

**Лавандула**>**Коприва-лист**

*In vitro* антиоксидантна активност по ORAC

**Лавандула** ( $1742.0 \pm 93.2 \mu\text{mol TE/g}$ )>**Коприва-лист**>**Липа**>**Коприва-корен** ( $158.9 \pm 9.2 \mu\text{mol TE/g}$ )

Пречистените ПЗ-ни фракции могат да бъдат подредени в следните редове по своята активност при  $100 \mu\text{g/mL}$  (пробите са анализирани едновременно в отделните анализи):

*Ex vivo* стимулиране продукцията на РФК от човешки неутрофили

**NR-PSIV**>**NR-PSIII**>**NR-PSII**>**PSIII**>**NR-PSI**>**NL-PSI**>**chPS-L1**>**chPS-L2**>**PSI**>**PSII**.

*Ex vivo* потискане активираната с OZP продукция на РФК в човешка кръв (противовъзпалителен потенциал)

**chPS-L2\***>**chPS-L1#**>**NL-PSI**>**NR-PSIII**>**PSII**>**NR-PSIV**>**NR-PSI**>**NR-PSII**>**PSI**>**PSIII**.

\*индуцира най-силно експресията на CD18 върху неутрофили.

#потиска и РМА активираната продукция на РФК от изолирани неутрофили.

*In vitro* стимулиране продукцията на NO от миши макрофаги след 48 h

**NR-PSIV** ( $26.9 \pm 4.3 \mu\text{M NO}_2^-$ )>**PSI**>**chPS-L1(2)**>**NL-PSI**>**PSIII**>**NR-PSIII**>**PSII**>**NR-PSII**=**NR-PSI** ( $0.4 \pm 0.1 \mu\text{M NO}_2^-$ ).

Степен на потискане синтеза на NO от миши макрофаги в присъствие на ЛПЗ от *E. coli* (противовъзпалителен потенциал)

**NR-PSIV\***>**chPS-L1**>**PSI**>**chPS-L2**>**NR-PSIII**>**NL-PSI**>**PSII**>**PSIII**>**NR-PSII**>**NR-PSI**.

\*замърсена с ЛПЗ с установена ниска активност (вж. Глава 6).

*Ex vivo* интестинална имуномодулираща активност

**NR-PSIV**>**АМОЛ-1**>**chPS-L1**>**chPS-L2**>**NL-PSI**>**NR-PSIII**>**PSI**>**NR-PSI**>**NR-PSII**>**PSIII**>**PSII**

Специфично *in vitro* потискане на клетки на белодробен аденокарцином (A549) след 48 h на третиране

**NR-PSIV** ( $31.7\% \pm 2.0$ )>**chPP-L** (полифенолна фракция)=**NR-PSIII** (21%)

\*Останалите ПЗ-ни фракции инхибират и контролните нормални амниотични (FL) клетки.

След 24 h третиране: **chPP-L** ( $26.9\% \pm 2.7$ )>**NR-PSIV**>**NR-PSIII** ( $4.2\% \pm 1.5$ ).





## VI. ИЗВОДИ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Съобразно структурирането на дисертацията бяха направени следните индивидуални изводи от всяка една глава:

1. Продължителната екстракция с гореща вода е надежден начин за получаване на богати на пектинови ПЗ комплекси с висока *in vitro* комплемент-фиксираща активност по АП и висок *ex vivo* интестинален имуномодулиращ ефект. Комплексът от коприва (корен) показва най-мощното имуномодулиращо действие с  $IC_{50} = 21.1 \mu\text{g/mL}$  по АП и най-високата интестинална имуномодулираща активност при  $100 \mu\text{g/mL}$  от 42-те изследвани проби.
2. Комбинирането (1:1) по двойки на ПЗСК-и от липа, лавандула и тученица доведе до синергизъм в антикомплементарното действие по АП ( $IC_{50} \leq 45 \mu\text{g/mL}$ ). Фитохимичните и биологичните изследвания показаха, че физико-химично свързаните полифеноли повлияват положително активността на изходните билкови ПЗСК-и по КП. Обратно, мастните киселини в ПЗСК-и по-скоро повлияват отрицателно тяхното действие по КП и затова активността им по този път е по-ниска. Високата активност на ПЗСК-и по АП е свързана основно с пектините.
3. ПЗК-и от липа, лавандула и тученица стимулират *ex vivo* активността на различни Т-клетъчни субпопулации и фагоцитарни левкоцити, изолирани от човешка кръв. Те активират също *ex vivo* продукцията на РФК в кръвта. На тази основа се приема, че изследваните билкови комплекси могат да модулират активността на имунни клетки от ПП чрез  $CD4^+/CD25^+$  и  $CD8^+/CD25^+$  Т-клетките, и фагоцитите, които се съдържат в ПП.
4. Открито е, че лавандуловите пектини активират вродения и придобития имуноен отговор през кръвта и съдържащите се в нея СК, неутрофили, макрофаги, а също и през имунокомпетентните клетки от чревните ПП. Наблюдаваните потискащи ефекти на chPS-L1 фракцията срещу РМА и OZP активираната продукция на РФК в кръвта, и супресията на продукцията на NO от макрофагите при костимулирането с chPS-L1 и ЛПЗ-те, разкриват противовъзпалителния потенциал на лавандуловите пектини. Високата комплемент-фиксираща активност на chPS-L1 и нейният ефект върху експресията на  $\beta_2$ -интегрин при неутрофилите се предполага, че са свързани с инхибиращата активност на фракцията върху РМА и OZP предизвиканата продукция на РФК.
5. В цветовете на сребролистната липа беше открит високомолекулен РГ-I (PSIII), имащ почти напълно O-3 глюкуронидирани GalA единици с >30% O-3 ацетилиране при Rha остатъци. Анализите с PSIII разкриват, че ацетилираният и силно глюкуронидиран РГ-I може да прояви имуномодулиращо действие през фагоцитите. Уникалният PSIII и типичният пектин PSI стимулират активността на фагоцитарните левкоцити, като при симулирана стерилна инфекция на човешка кръв или миши макрофаги с опсонизиран зимосан или ЛПЗ съответно проявяват противовъзпалителен потенциал. Типичният пектин PSI, изграден от ХГ-ов регион, последван от РГ-I със странични вериги от АГ-II показва по-висока комплемент-фиксираща и макрофаго-стимулираща активност от PSIII, но по-ниска активност върху неутрофилите от него.
6. ПЗ-те от листата и корените на копривата проявяват *ex vivo* и *in vitro* противовъзпалителна активност върху продукцията на РФК в (от клетките в) човешка кръв и NO от миши макрофаги в присъствие на микробиални антигени с ПЗ-ен произход. За разлика от глюканите, пектините в копривата проявяват и имуностимулиращ ефект върху активирането на продукцията на NO от макрофаги в отсъствие на ЛПЗ. Пектиновата фракция от корените (NR-PSIV) показва най-мощната *ex vivo* интестинална имуномодулираща активност от изследваните, пречистени ПЗ в дисертацията. Освен това тя беше и единствената ПЗ-на фракция в работата с ясно изразена специфичност на *in vitro* антитуморното действие.

От представените изводи може да се каже аргументирано, че киселите хетерополизахариди от пектинов тип в българските лечебни растения проявяват ясно изразена имуномодулираща

активност с имуностимулиращ и противовъзпалителен потенциал. С най-висока активност се откриха пектините със силно разклонена РГ-I област, богата на 1,(3),5-арабинани, арабино-3,6-галактани (АГ-II) и най-вече тези с най-високо съдържание на 1,6-Galp и T-Galp. На базата на изследванията беше открито, че пектините в цветовете на липата, лавандулата и листата на копривата допринасят за техния известен в етнофармакологията и медицината противовъзпалителен ефект. ПЗ-те на трите растения, заедно с изследваните и допълнително охарактеризирани от нас ПЗ от тученицата и корените на копривата, могат да служат за разработването на нови функционални храни и напитки с приложение във фитотерапията, рационалното и диетичното хранене на човека. Допълнително при подходящо съчетаване на ПЗ-те с полифенолите могат да се получат функционални продукти с имуномодулиращо и антиоксидантно действие, в които антагонистично се допълват противовъзпалителните свойства на тези съединения при потискане на оксидативния стрес в условия на инфекция. Получените резултати от проведеното мащабно изследване могат да служат в сегашно време като основа за създаване на вторични продукти с добавена стойност от култивирани български билки. Това ще спомогне за увеличаване на brutния вътрешен продукт на страната и произтичащите от това социални ползи за обществото.

### НАУЧНИ ПРИНОСИ

1. За първи път е охарактеризиран съставът на водно-екстрахируемите ПЗ в 11 европейски и в частност български лечебни растения, като е определен техният имуномодулиращ потенциал *in vitro* и *ex vivo*. Открито е, че ПЗСК-и от редица широко използвани билки повлияват интестиналната имунна система. ПЗСК-и от двете най-сериозно застъпени ботанически семейства в работата Rosaceae и Lamiaceae съдържат представителни количества кисели ПЗ, като броят на активните комплекси от втората група е по-голям.
2. Изолиран е за първи път от цветовете на липата уникален пектинов ПЗ с имуномодулираща активност с противовъзпалителен потенциал, представляващ необичайно ацетилирана при Rha (>30%) и силно глюкуронидирана при GalA (почти 1:1) основна верига на РГ- I.
3. Открито е, че в цветовете на обикновената лавандула се съдържат БА, ацетилирани и високометоксилирани пектинови ПЗ, богати на ХГ, последван от РГ-I със странични вериги от АГ-II. Лавандуловите пектини показват *ex vivo* имуностимулиращо действие върху фагоцитарни левкоцити и интестинална имуномодулираща активност.
4. Открито е, че в листата на широко консумираната обикновена коприва се съдържат имунологично активни пектини. Структурата и активността на ПЗ-те от листата беше сравнена с тази на ПЗ-те с мощно имуностимулиращо действие от корените на растението.
5. Открито е, че в противовъзпалителното действие на лавандулата, липата и копривата участват и пектините, за които беше намерено също, че допринасят за имуномодулиращото действие на трите билки.

### НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ

Резултатите от дисертационния труд са с практическо приложение в реално време и по възможностите на настоящата българска икономика:

1. Получена е за първи път в Европа толкова обемна справочна информация за съдържанието на водно-екстрахируеми ПЗ едновременно в 34 широко използвани лечебни растения и горски плодове с ежедневна или специфична употреба.
2. Определена е *in vitro* комплемент-фиксиращата способност, антиоксидантната активност и за първи път *ex vivo* интестиналният имуномодулиращ потенциал на 42 ПЗСК-а от 34 билки, от които 29 билки са със стопанско значение.
3. Проведено е задълбочено охарактеризиране на имуномодулиращия потенциал на водно-екстрахируемите ПЗ от 4 билки с нарастващо стопанско значение в света - коприва (корен и лист), тученица, липа и лавандула.



## VII. ОБУЧЕНИЕ И ПРЕДСТАВЯНЕ НА ДИСЕРТАЦИЯТА

### Участие в специализирани курсове по време на докторантурата

#### *В рамките на Академията*

1. Курс по „Масспектрометрия и протеомика – методи и приложение“ в ИОХЦФ-БАН през летен семестър на академичната 2014-2015 г.
2. Курс по ЯМР спектроскопия в ИОХЦФ-БАН през летен семестър на академичната 2013-2014 г.
3. Курс по компютърна програма MATLAB в Центъра за обучение при БАН през летен семестър на академичната 2013-2014 г.

#### *В чужбина (на конкурсен принцип)*

1. Докторантска мобилност по Секторна програма „Еразъм+“ с цел обучение, катедра Експериментална биология, Факултет по природни науки, Масариков университет, гр. Бърно, Чешка република. Дисциплини: Биоаналитика I – биомакромолекули; Методи на разделяне A; Биомаркери и механизми на токсичност; Статистическо мислене и обработка на данни. Зимен семестър на академичната 2015-2016 г. (4 месеца).
2. Training on „GC-MS application in the area of soil and water contamination with traces of hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons, and identification of fatty acid methyl esters in vegetable oil“, Faculty of Technology, University of Novi Sad, Novi Sad (Serbia), International Summer Schools 2014, Center of Applied Spectroscopy, DAAD within the Stability Pact for South Eastern Europe, 20<sup>th</sup> – 27<sup>th</sup> July 2014 (one week).
3. Training on „HPLC application in the area of food constituents (caffeine and catechines) and toxin (coumarin) determinations“, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor, Maribor (Slovenia), International Summer Schools 2014, Center of Applied Spectroscopy, DAAD within the Stability Pact for South Eastern Europe, 13<sup>th</sup> – 20<sup>th</sup> July 2014 (one week).

### Специализации в чужбина по дисертацията

1. Специализация по модулация на активността на фагоцитарните левкоцити с билкови ПЗ при доц. д-р Antonin Lojek в катедра Патофизиология на свободните радикали, Институт по биофизика към Чешката академия на науките, гр. Бърно, Чешка република. (4 месеца, 2015-2016, свързано с т. 1 по-горе). Финансиране само на експерименталната работа по проект на Министерството на образованието, младежта и спорта на Чехия [№ LQ1605 NPU II; проект MSM0021622430].
2. Специализация по изучаване структурата на билковите ПЗ при проф. Verit Paulsen в катедра Фармацевтична химия, Институт по фармация, Университет на Осло, гр. Осло, Кралство Норвегия (1 месец, 2016 г.). Финансиране по проект „Изучаване структурата на имунологично активните пектинови ПЗ от българска лавандула и затваряне на цикъла структура-биологична активност“, Програма BG09 „Фонд за стипендии на Европейското икономическо пространство“, МОН. Ръководител – докторант Йордан Георгиев, ИОХЦФ-БАН (приключил).
3. Специализация по модулация на интестиналната имунна система с билкови ПЗ при проф. Haruki Yamada и проф. Hiroaki Kiyohara в лаборатория „Биофармакология на фитотерапевтиците“, Институт по природни науки „Китасато“ към Университета „Китасато“, гр. Токио, Япония. (1 месец, 2014 г.). Финансиране по проект „Структура и биологична активност на пектинови ПЗ, и получаване на нутрацевтици от тях“, по проект BG051PO001/3.3-05-0001 „Наука и бизнес“ от ОП „Развитие на човешките ресурси“, мярка „Подбор на пост-докторанти и млади учени за едномесечни обучения във високотехнологични научни комплекси и инфраструктури“, МОН. Ръководител – докторант Йордан Георгиев, ИОХЦФ-БАН. (приключил)

## Участие в конференции по темата на дисертацията

### Доклади

1. Georgiev Y., Ognyanov M., Kussovski V., Batsalova T., Dimitrova R., Denev P., Dzhambazov B., Antonova D., Kiyohara H., Číž M., Lojek A., Krastanov A., Yamada H., Kratchanova M. *In vitro* evaluation of the immunomodulatory potential of polysaccharide-containing complex from *Bulgarian lavender* and its active constituents. 4<sup>th</sup> EPNOE International Polysaccharide Conference 19<sup>th</sup> – 22<sup>th</sup> October 2015, Warsaw (Poland).
2. Georgiev Y., Ognyanov M., Yanakieva Y., Kratchanova M., Kratchanov Chr. Importance and application of immunomodulating herb polysaccharides in functional and dietary nutrition. X<sup>th</sup> National Congress of Nutrition with International Participation, 27<sup>th</sup> – 30<sup>th</sup> May 2015, „St. St. Konstantin and Elena“, Varna, Bulgaria.
3. Georgiev Y., Ognyanov M., Batsalova T., Kussovski V., Kiyohara H., Yamada H., Denev P., Číž M., Lojek A., Dzhambazov B., Kratchanova M. Chemical characterization and immunomodulating activity of selected crude herb polysaccharide extracts. First National Conference in Biotechnology „30 years Biotechnology in Bulgaria“, 17<sup>th</sup> – 18<sup>th</sup> October 2014, Sofia University, Sofia, Bulgaria.
4. Georgiev Y., Ognyanov M., Kussovski V., Kiyohara H., Yamada H., Yanakieva I., Denev P., Kratchanova M., Kratchanov Chr. Screening of selected Bulgarian herbs for immunomodulating acidic heteropolysaccharides (Part 1). 3<sup>rd</sup> Balkan Scientific Conference on Biology, May 30<sup>th</sup> – 1<sup>st</sup> June 2014, Plovdiv University Paisii Hilendarski, Plovdiv, Bulgaria.
5. Georgiev Y., Ognyanov M., Kussovski V., Kiyohara H., Yamada H., Yanakieva I., Denev P., Kratchanova M., Kratchanov Chr. Screening of selected Bulgarian herbs for immunomodulating acidic heteropolysaccharides (Part 2). International Scientific Conference „1<sup>st</sup> Trakia Medical Days“, 22<sup>th</sup> – 23<sup>th</sup> May 2014, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria.
6. Георгиев Й., Огнянов М., Янакиева И., Късовски В., Киохара Х., Ямада Х., Крачанова М., Крачанов Хр. Имуномодулиращи кисели хетерополизахариди от български лечебни растения. VII<sup>ма</sup> Национална конференция по хранене, 16-18 май 2014, к. к. „Св. Св. Константин и Елена“, гр. Варна, България.
7. Georgiev Y., Ognyanov M., Yanakieva I., Kussovski V., Kratchanova M. Pectinolytic enzymes – application for studying and preparation of immunomodulating pectic polysaccharides from fruits, vegetables and medicinal plants. Scientific Conference with International Participation „Food Science, Engineering and Technologies – 2013“, 18<sup>th</sup> - 19<sup>th</sup> October, Plovdiv.

### По покана

1. Георгиев Й. Структура и биологична активност на пектинови ПЗ и получаване на нутрацевтици от тях. Тематична научна школа и борса за научни идеи на тема „Зелена химия“, по покана от МОН, 06-09 април 2014, гр. Бургас, България.
2. Georgiev Y. PhD project presentation: „Immunomodulating herbal acidic heteropolysaccharides“, Seminar of research group „Bioactive natural products and health effects“, School of Pharmacy, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Oslo, 20<sup>th</sup> April, 2016.

### Постери

1. Georgiev Y., Ognyanov M., Yanakieva Y., Kussovski V., Kiyohara H., Denev P., Antonova D., Číž M., Lojek A., Yamada H., Kratchanova M. Immunologically active polysaccharide containing complexes from traditional and perspective European medicinal plants. 2<sup>nd</sup> International Conference on Natural Products Utilization: „From Plants to Pharmacy Shelf“, 14<sup>th</sup> – 17<sup>th</sup> October 2015, Plovdiv, Bulgaria.
2. Денев П., Георгиев Й., Огнянов М., Крачанова М., Крачанов Хр. Приложение на български билки при разработване на нутрацевтици с антиоксидантно действие. VII<sup>ма</sup> Национална

конференция по хранене, 16-18 май 2014, к. к. „Св. Св. Константин и Елена“, гр. Варна, България.

### Научни статии по темата на дисертацията

1. Georgiev Y.N., Paulsen B.S., Kiyohara H., Ciz M., Ognyanov M.H., Vasícek O., Rise F., Denev P.N., Batsalova T.G., Dzhambazov B.M., Lojek A., Yamada H., Lund R., Barsett H., Krastanov A.I., Yanakieva I.Z., Kratchanova M.G. (2017). *Tilia tomentosa* pectins exhibit dual mode of action on phagocytes as  $\beta$ -glucuronic acid monomers are abundant in their rhamnogalacturonans I. *Carbohydrate Polymers*, 175, 178-191. (IF= 4.811, 2016)
2. Georgiev Y.N., Ognyanov M.H., Kiyohara H., Batsalova T.G., Dzhambazov B.M., Ciz M., Denev P.N., Yamada H., Paulsen B.S., Vasicek O., Lojek A., Barsett H., Antonova D., Kratchanova M.G. (2017). Acidic polysaccharide complexes from purslane, silver linden and lavender stimulate Peyer's patch immune cells through innate and adaptive mechanisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 730-740. (IF= 3.671, 2016)
3. Georgiev Y.N., Paulsen B.S., Kiyohara H., Ciz M., Ognyanov M.H., Vasicek O., Rise F., Yamada H., Denev P.N., Lojek A., Kussovski V., Barsett H., Krastanov A.I., Yanakieva I.Z., Kratchanova M.G. (2017). The common lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) pectic polysaccharides modulate phagocytic leukocytes and intestinal Peyer's patch cells. *Carbohydrate Polymers*, 174, 948-959. (IF= 4.811, 2016)
4. Georgiev Y.N., Ognyanov M.H., Denev P.N., Kratchanova M.G. (2017). Chapter X. Perspective therapeutic effects of immunomodulating acidic herbal heteropolysaccharides and their complexes in functional and dietary nutrition. In: A.M. Holban, & A.M. Grumezescu (Eds.), *Handbook of Food Bioengineering*, Therapeutic Foods, Section 3: Medical impact, p. 285, Cambridge: Elsevier, ISBN: 9780128115176.
5. Georgiev Y., Ognyanov M., Yanakieva I., Kussovski V., Kratchanova M. (2013). Pectinolytic enzymes – application for studying and preparation of immunomodulating pectic polysaccharides from fruits, vegetables and medicinal plants. *Scientific Works of the University of Food Technologies*, 60(1): 740-755, ISSN 1314-7102.

### Забелязани цитирания по дисертацията

Georgiev Y., Ognyanov M., Kussovski V., Batsalova T., Dimitrova R., Denev P., Dzhambazov B., Antonova D., Kiyohara H., Číž M., Lojek A., Krastanov A., Yamada H., Kratchanova M. *In vitro* evaluation of the immunomodulatory potential of polysaccharide-containing complex from Bulgarian lavender and its active constituents. 4<sup>th</sup> EPNOE International Polysaccharide Conference 19<sup>th</sup> – 22<sup>th</sup> October 2015, Warsaw (Poland).

1. Boeriu, C.G. Plants4Cosmetics: perspectives for plant ingredients in cosmetics (p. 22). Wageningen UR Food & Biobased Research, report nr. 1603, October 2015.

### Глава 3

1. Wang H., Bi H., Gao T., Zhao B., Ni W., Liu J. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2017, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.083>

### Глава 4

1. do Nascimento G.E., Winnischofer S.M.B., Ramirez M.I., Iacomini M., Cordeiro L.M.C. *Food Res. Int.*, 2017, doi: 10.1016/j.foodres.2017.09.037.
2. Wang H., Bi H., Gao T., Zhao B., Ni W., Liu J. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2017, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.083>

### Глава 5

1. do Nascimento G.E., Winnischofer S.M.B., Ramirez M.I., Iacomini M., Cordeiro L.M.C. *Food Res. Int.*, 2017, doi: 10.1016/j.foodres.2017.09.037.
2. Wang H., Bi H., Gao T., Zhao B., Ni W., Liu J. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2017, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.083>

## ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА:

- Ataee R.A., et al. *J. Pure Appl. Microbiol.* 6(1), 2012, 75-84.
- Bethke G., et al. *The Plant Cell* 28, 2016, 537-556.
- Carvalho A.R., et al. *Food. Res. Int.* 2017 (in press) <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.008>
- Chen C.-H., et al. *Biochem. Pharmacol.* 72, 2006, 1001-1009.
- Chen X., et al. *Int. J. Biol. Macromol.* 49, 2011, 50-54.
- de Santana-Filho A.P., et al. *Carbohydr. Polym.* 87(4), 2012, 2730-2734.
- Denev P., et al. *Acta Biochim. Pol.* 61(2), 2014, 359-367.
- Denman L.J., & Morris G. *Carbohydr. Polym.* 117, 2015, 364-369.
- Endress H.U. *Renewable Resources for Functional Polymers and Biomaterials*. RSC Polymer Chemistry Series No. 1, 2011, RSC Publishing, Cambridge, pp. 210-260.
- Fan Y., et al. *Mol. Med. Rep.* 5(5), 2012, 1185-1190.
- Fearon D.T., & Austen K.F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74(4), 1977, 1683-1687.
- Gallet M., et al. *Acta Biomater.* 5, 2009, 2618-2622.
- Inngjerdigen M., et al. *Glycobiology* 8, 2008, 1074-1084.
- Jakobek L. *Food Chem.* 175, 2015, 556-567.
- Kačuráková M., et al. *Carbohydr. Polym.* 43, 2000, 195-203.
- Keizman D., et al. *J. Clin. Oncol.* 35 DOI: 10.1200/JCO.2017.35.15\_suppl.e16588
- Kiyohara H., et al. *Evid. Based. Complement. Altern. Med.* 2011, 2011, Article ID 492691, 13 pages.
- Kiyohara H., et al. *Phytochemistry* 71, 2010, 280-293.
- Kiyohara H., et al. *Phytomedicine* 13, 2006, 494-500.
- Kram G., & Franz G. *Planta Med.* 49, 1983, 149-153.
- Kratchnova M., et al. *Acta Biochim. Pol.* 57, 2010, 229-234.
- Li Y., et al. *Int. J. Biol. Macromol.* 68, 2014, 113-116.
- Lichius J.J., et al. *Pharmazie* 54, 1999, 768-771.
- Liu Q.-Y., et al. *J. Ethnopharmacol.* 136, 2011, 457-464.
- Lojek A., et al. *Phytochem. Rev.* 13, 2014, 499-510.
- Lynn W.A., et al. *J. Immunol.* 147(9), 1991, 3072-3079.
- Makarova E.N., et al. *Carbohydr. Polym.* 92, 2013, 1817-1826.
- Matsuda H., et al. *Bioorg. Med. Chem.* 10, 2002, 707-712.
- Matsumoto T., et al. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 7(3), 2010, 331-340. doi:10.1093/ecam/nen007.
- McNeil M., et al. *Plant Physiol.* 66, 1980, 1128-1134.
- Motoo Y., et al. *Complement. Ther. Med.* 17, 2009, 147-154.
- Oh S.R., et al. *Kor. J. Pharmacogn.* 27, 1996, 20-2.
- Papakotsi V., et al. *Pre-Proceedings of Berry Health Benefits Symposium* (p. 80), 28th-30th March 2017, Pismo Beach, CA – USA.
- Perrone P., et al. *Phytochemistry* 60, 2002, 67-77.
- Popov S.V., & Ovodov Y.S. *Biochemistry (Moscow)* 78, 2013, 823-835.
- Renard C.M.G.C., & Jarvis M.C. *Carbohydr. Polym.* 39, 1999, 201-207.
- Renard C.M.G.C., et al. *Eur. J. Biochem.* 266, 1999, 566-574.
- Ross G.D., & Větvička V. *Clin. Exp. Immunol.* 92, 1993, 181-184.
- Schols H.A., & Voragen A.G.J. *Pectins and Their Manipulation*, 2002, Blackwell Publishing; CRC Press; Oxford, 1-29.
- Sengkhamparn N., et al. *Carbohydr. Res.* 344, 2009, 1842-1851.
- Shakhmatov E.G., et al. *Carbohydr. Polym.* 102, 2014, 521-528.
- Shakhmatov E.G., et al. *Carbohydr. Polym.* 123, 2015, 228-236.
- Shakhmatov E.G., et al. *Carbohydr. Polym.* 136, 2016, 1358-1369.
- Shimizu N., & Tomoda M. *Chem. Pharm. Bull.* 33(12), 1985, 5539-5542.
- Shuzi M., et al. *European Patent Office, Patent № 0038667 (A1)*, 1981.
- Šutovská M., et al. *Int. J. Biol. Macromol.* 52, 2013, 192-197.
- Synysya A., et al. *Carbohydr. Polym.* 54, 2003b, 97-106.
- Synysya A., et al. *Czech J. Food Sci.* 21(1), 2003a, 1-12.
- Tomoda M., & Satoh N. *Chem. Pharm. Bull.* 25(11), 1977, 2910-2916.
- Vasisht K., et al. *Curr. Pharm. Des.* 22(27), 2016, 4288-336.
- Vauquelin M. *Ann. Chim.* 5, 1790, 92-106.
- Wagner H., & Kraus S. *Bioactive Carbohydrate Polymers*, 2000, Kluwer Academic Publisher, The Netherlands, 1-14.
- Wagner H., et al. *Plant. Med.* 55, 1989, 452-454.
- Wang S., et al. *J. Glycomics Lipidomics* 6(2), 2016, 138. doi:10.4172/2153-0637.1000138.
- Wangenstein H., et al. *J. Ethnopharmacol.* 176, 2015, 429-437.
- Xie Y., et al., *Int. J. Biol. Macromol.* 72, 2015, 946-950.
- Yamada H. & Kiyohara H. *Comprehensive Glycoscience: From Chemistry to Systems Biology*, 2007, Elsevier; Oxford, 663-694.
- Zhang H., et al. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 7(22), 2013, 1438-1447.