

Българска Академия на Науките
Институт по експериментална морфология, патология и
антропология с музей

АВТОРЕФЕРАТ

на Ангелики Константинову

за присъждане на образователната и научна степен „Доктор” в
професионално направление 4.3. Природни науки, научна специалност
Биохимия

на тема:

**"Оптимизация на продукцията на биологичноактивни вещества
от бактерии и водорасли и оценка на потенциалното им действие
като антитуморни агенти в *in vitro* експерименти"**

Научни консултанти:

проф. д-р Светлозара Петкова

доц. д-р Людмила Кабаиванова

София, 2022г.

Дисертацията е написана на 100 страници и е онагледена с 45 фигури.

Библиографската справка обхваща 100 литературни източника.

Дисертационният труд е одобрен и насочен за защита на разширено заседание на секция „Патология“, ИЕМПАМ-БАН, проведено на 06.07.2022 г.

Защитата на Дисертационния труд ще се състои на 2022 г. от часа на открито заседание на Научно жури в състав:

Вътрешни членове:

Проф. д-р Димитър Кадийски, дмн - ИЕМПАМ

Доц. Иван Илиев, доктор ИЕМПАМ

Външни членове:

Проф. Йоанис Папатанасиу (МУ-София),

Доц. Адриана Гущерова (ИМикБ-БАН),

Доц. Нина Цветкова (НЦЗПБ)

Материалите по защитата се намират на разположение в канцеларията на ИЕМПАМ-БАН, ул. „Акад. Георги Бончев“, Бл. 25, стая 209.

БЛАГОДАРНОСТИ

Искрено благодаря на научните си консултанти проф. д-р Светлозара Любомирова Петкова (ИЕМПАМ-БАН) и доц. Доц. д-р Людмила Владомирова Кабаиванова - Миланова (ИМикБ-БАН) за помощта и напътствията, които направиха възможно осъществяването на това изследване. Благодаря на ръководството на ИЕМПАМ-БАН за административната подкрепа, която ми оказаха, при оформяне на документацията през целия период на докторантурата. Изказвам благодарност на колектива от секция „Патология“ – ИЕМПАМ за помощта и оказаното съдействие, при експерименталната работа и оформянето на дисертационния труд. Сърдечни благодарности на семейството и приятелите ми за разбирането, търпението и подкрепата по време на изработването на този дисертационен труд.

СЪДЪРЖАНИЕ

I.	УВОД	3
II.	МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	6
III.	РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ	13
IV.	ИЗВОДИ	52
V.	ПРИНОСИ	54
VI.	ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ПРОЕКТ	56

I. УВОД

В глобален план научните изследвания, фокусирани върху нови биологичноактивни вещества и технологии за приложението им за използването им в различни сектори, се извършват с надеждата, че биологичните и медицинските им приложения ще бъдат широко използвани в следващото десетилетие. Това се обосновава на задълбочаване на усилията да се намери разрешение на различни медицински проблеми. Изолирането, характеризирането и изследването на свойствата на нови биоактивни съединения са решаваща част от фундаменталните изследвания в областта на биологията и медицината и предоставят неограничени възможности за открития на нови медикаменти.

Характеризиране и изучаване свойствата на нови биологично активни вещества и изпитване на тяхното действие върху някои видове ракови клетки е цел на изследванията на много изследователи.

Въвеждането в практиката на терапевтични агенти с биологичен произход, изолирани от някои видове бактерии и водорасли и потенциалната възможност за лечение на ракови заболявания се обосновава на по-ниската им токсичност, а от там и по-голяма безопасност в сравнение със синтетичните фармацевтични продукти. В това отношение потенциалът на микробните продуценти и микроводораслите е огромен. От биологичноактивните компоненти, изолирани от водорасли с най-голямо значение за биологията и медицината са комплексните полизахариди, както и някои пигменти. Не по-маловажно е получаването на биологичноактивни вещества от бактерии, чрез подбор на подходящи щамове продуценти, оптимизиране на условията за увеличен синтез, последвани от тяхното пречистване и характеризиране за оценяване на активности, като повлияването жизнеността и преживяемостта на някои туморни клетки. Това е една важна основа за задълбочаване на проучванията и експериментите за третиране на някои типове злокачествени туморни клетки, и съответно здрави такива с очакване, че няма да бъде нанесена вреда върху здравите клетки, а именно засвидетелстване наличие на специфична цитотоксичност.

Установяването на антитуморното действие на новополучени вещества с природен произход и изпитването им в *in vitro* експерименти върху ракови и нормални клетъчни линии би довело до напредък в развитието на биомедицината,

а от там и в повишаване качеството на живот, което е цел на учените в световен мащаб.

Биотехнологията на микроводораслите се превърна в обект на изследване в различни области, поради разнообразните биопродукти, които могат да бъдат получени от тези микроорганизми. Когато процесите на култивиране на микроводораслите се разберат по-добре, микроводораслите могат да се превърнат в екологично чист и икономически жизнеспособен източник на съединения, представляващи интерес, тъй като производството може да бъде оптимизирано в контролирана култура. Тези продукти могат да бъдат пречистени и характеризирани, могат да претърпят химически модификации и тяхната биоактивност може да бъде подобрена за по-нататъшно биомедицинско приложение. Хетерополизахаридите на червените водорасли привличат много внимание в биохимичните и медицинските области поради техните противоракови ефекти и способността да инхибират растежа на раковите клетки, да стимулират имунния отговор и да индуцират апоптоза.

Природните метаболити от водорасли и бактерии, които проявяват цитотоксична активност, показват ценни ефекти при химиотерапията, само когато тяхната токсичност е по-висока за раковите клетки, отколкото за нераковите такива. Тази селективност спрямо специфични ракови клетъчни линии е едно от изискванията за разработването на нови лекарства, които имат намалена степен на страничните ефекти.

Въпреки интензивните изследвания в тази област през последните години, механизмът на действие на различните биопродукти от различен естествен произход на клетъчно ниво предстои да бъде напълно изяснен. Тези открития поставят основите за възможно приложение на биопродукти от бактерии и водорасли като нови противоракови лекарства, подходящи за клинични изпитвания.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

1. Цел

Търсене на нови природни субстанции с бактериален и водораслов произход, оптимизация на тяхната продукция и изпитването на получените биологичноактивни вещества като потенциални агенти, притежаващи антитуморен ефект върху някои видове ракови клетки.

2. Задачи

Във връзка с така поставената цел, са набелязани следните задачи:

- Чрез оптимизиране на условията за растеж и развитие на подбрани бактериални и водораслови щамове да се повиши продукцията на биологичноактивни вещества с потенциално антитуморно действие.
- Определяне възможностите за имобилизация на клетките от избраните щамове и избор на най-ефективния подход и съответна матрица.
- Използване на избраните имобилизационни процедури за клетките от бактериалните и водораслови продуценти за увеличаване синтеза на търсените биологичноактивни вещества.
- Изпитване възможностите на подбраните имобилизирани препарати за многократно използване и оценка на получения продукт.
- Разработване на цялостна схема за получаване чрез включване на имобилизация, изолиране и изпитване на антитуморни свойства на получените гликолипидни биосърфактанти от бактерии и екзополисахаридите, получени от водорасли в *in vitro* експерименти.
- Оценка на действието на получените гликолипиди и полизахариди върху преживяемостта на здрави и някои ракови клетъчни линии.

II. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Бактериални продуценти, селекция и култивиране

Гликолипидите бяха изолирани чрез изпитване на различни родове бактерии от колекцията на ИМикБ, БАН - (*Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Pseudomonas* и др.).

Щамът *Pseudomonas aeruginosa* BN10 е изолиран от почва, замърсена с въгледороди. *Pseudomonas aeruginosa* BN10 и другият избран като продуцент щам *Rhodococcus wratislavensis* се размножават чрез стандартна техника за обогатяване и избрани поради способността им да произвеждат повърхностно активни съединения от гликолипиден тип. И двата щаме се поддържат в наклонени хранителни агари (Difco Laboratories Inc., Детройт, Мичиган, САЩ) при 4 °C. Култивирането се извършва в минерална солева среда с 2% n-хексадекан.

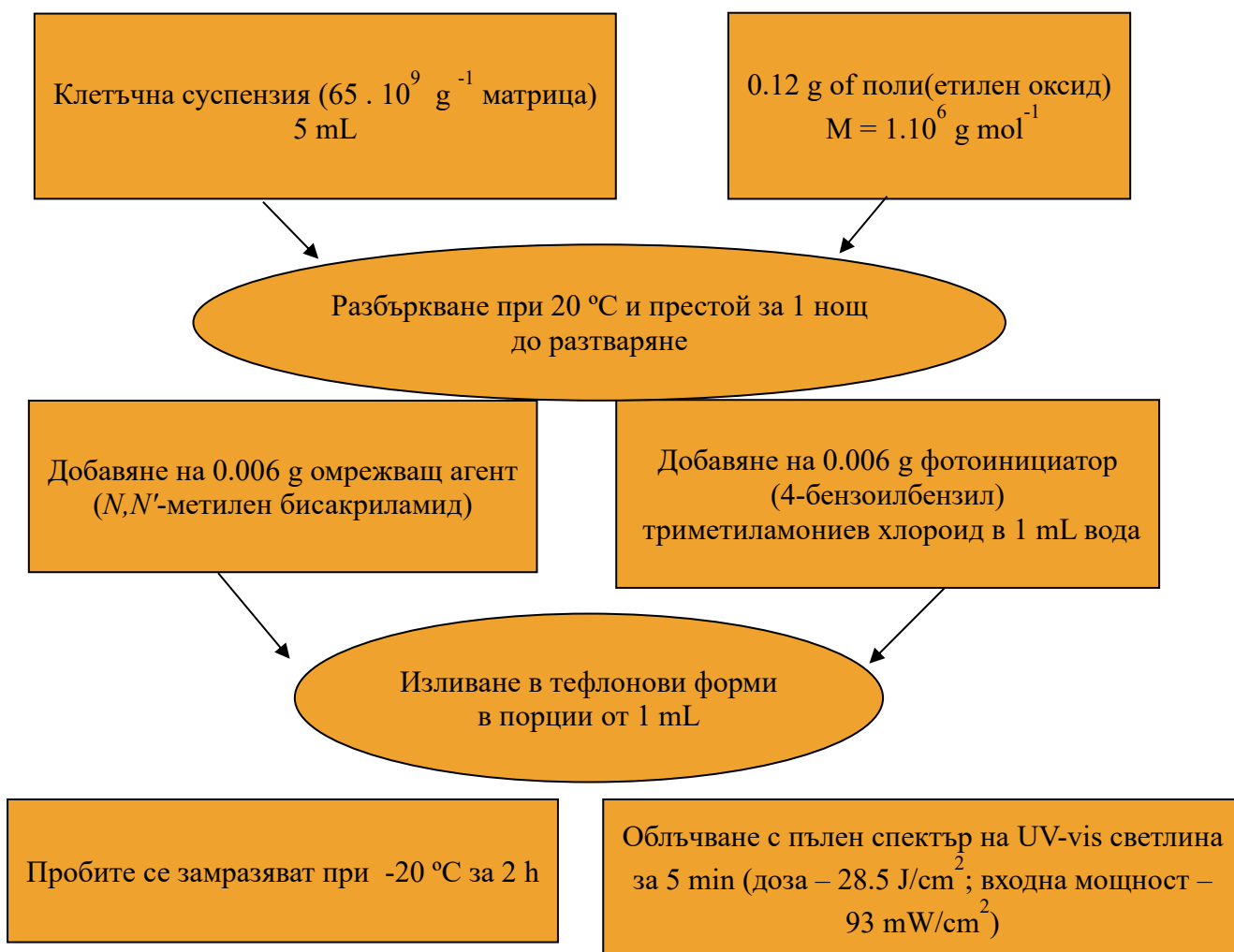
2. Изолиране и характеристика на получените биологичноактивни вещества от бактерии

Екстракцията се осъществява с еднакъв обем етилацетат. Органичната фаза беше отстранявана при понижено налягане при 40 °C и получената вискозна течност със светлокафяв цвят се счита за суров биосърфактант.

3. Имобилизация на бактериалните продуценти в два вида криогелове

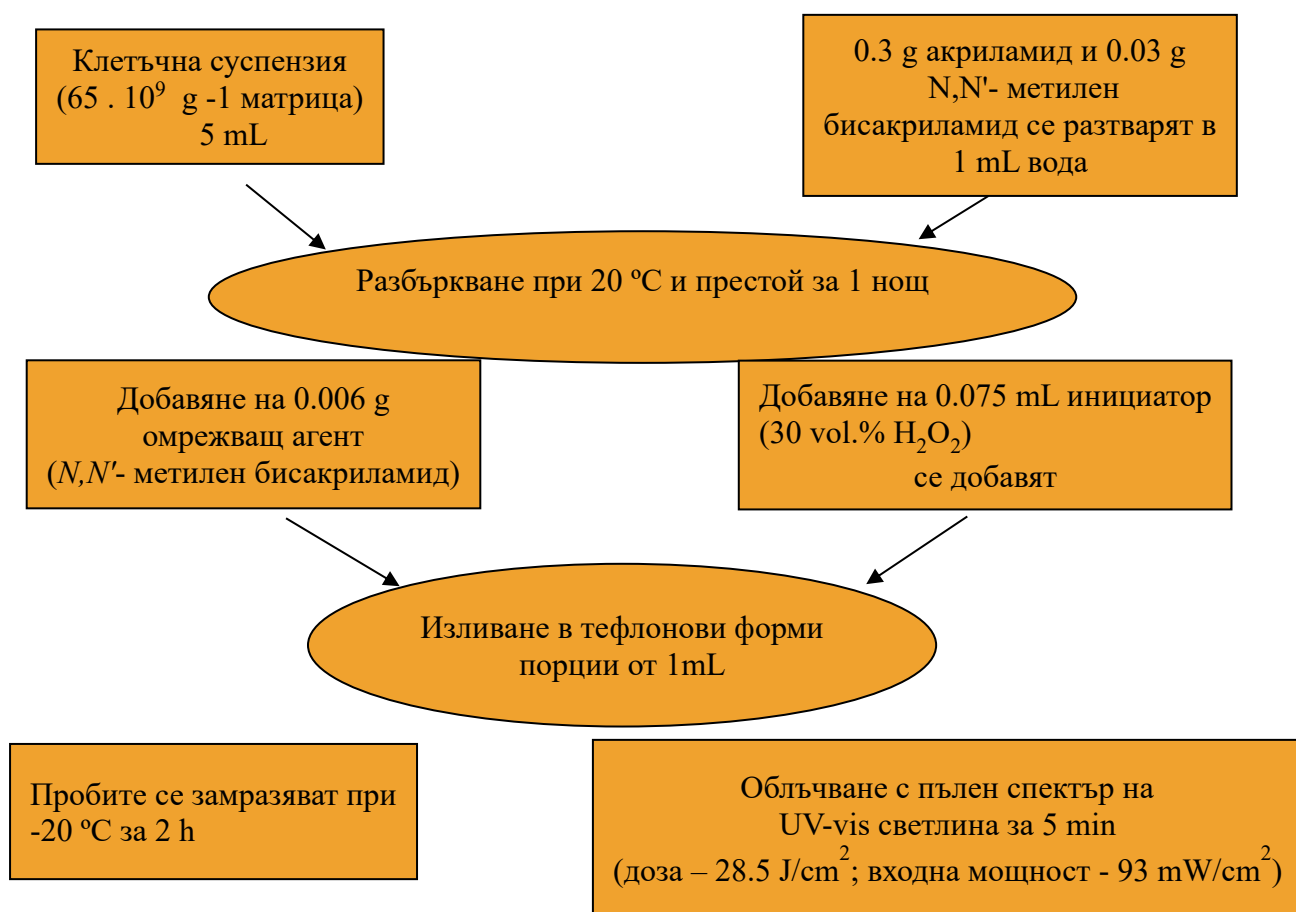
Клетките на избраните бактериални щамове бяха имобилизирани в два типа матрици – РЕО и РААm. Имобилизационните процедури бяха извършвани след подбор на подходяща матрица при всеки използван бактериален щам, след изпитването на множество такива, защото всички те имат своите особености.

3.1 Синтез на криогелове на основата на полиетилен оксид (PEO)



Фигура 6. Последователни етапи от получаването на криогелна матрица на основата на PEO

3.2. Синтез на криогелове на основата на полиакриламид (РААm)



Фигура 7. Последователни етапи от получаването на криогелна матрица на основата на РААm

4. Количествено определяне на биосърфактанти

Концентрациите на рамнолипиди и трехалозолипиди бяха количествено определени като бяха направени изчисления от подготвени стандартни криви с рамноза или трехалоза и бяха изразени като съответните еквиваленти (RE, TE) [mg mL⁻¹].

4.1. Повърхностно напрежение

За откриване на био-повърхностно активно вещество бяха използвани два прости предварителни метода: (1) Повърхностното напрежение (ST) на супернатантата се измерва, след центрофугиране при $8000 \times g$ за 20 минути, по метода на пръстена du Noüy с помощта на тензиометър (Крюс, Хамбург, Германия), [Khan and Islam, 2007, Pan et al., 1996].

4.2. Клетъчна хидрофобност

Хидрофобността на клетъчната повърхност се определя чрез бактериалната адхезия към въгледороди (BATH) и се измерва спектрофотометрично като %, както е описано от Rosenberg, [Rosenberg et al., 1980].

5. Водораслови продуценти и условия на култивиране

Търсените екзополизахариди се продуцират от клетки на червени водорасли.

Червените микроводорасли *Rhodella reticulata* (Rhodophyta) и *Porphyridium cruentum* (Rhodophyta) са използвани от колекцията на ИФРГ - БАН.

Rhodella reticulata се отглежда в модифицирана хранителна среда на Brody Emerson [Ivanova et al., 2015], а културалната среда, използвана за *Porphyridium cruentum* е според Brody и Emerson, [Brody and Emerson, 1959].

6. Изолиране и характеристика на получените биологичноактивни вещества от водорасли

Беше извършена изолация на полизахарида според Simon et al. [Simon et al., 1992]. Диализата се провежда в продължение на 48 часа при 4 °C. Полученият

полизахариден разтвор се стерилизира през бактериален филтър (0,2 μm), след това се изсушава чрез лиофилизация и в прахообразна форма се подава за следващи изследвания.

6.1. Измерване на сухо тегло

Измерване на сухото тегло на културата на водораслите беше извършвано чрез оценка на нарастването на тяхното тегло.

7. Имобилизация на водораслови клетки в криогелни матрици на основата на хидроксиетилцелулоза (HEC)

Супермакропорестия криогел на основата на HEC (2-хидроксиетилцелулоза) беше използван за имобилизация на *Rhodella reticulata*.

Имобилизирани препарати бяха включени в процес на продукция на екзополisahарид.



Фигура 8. HEC криогел (ляво), имобилизирани клетки на *Rhodella reticulata* (среда) и *Porphyridium cruentum* (дясно)

8. Определяне състава на синтезираните продукти

Извънклетъчните въглехидрати, получени от избраните щамове продуценти бяха анализирани по фенол-серния метод, описан от Nielsen [Nielsen, 2010], използвайки глюкоза като стандарт.

Съдържанието на сулфат в полизахаридите се определя по бариер-желатинов метод [Dodgson and Price, 1962], количеството протеин се определя по метод на Bradford [Bradford, 1976]. Присъствието и количеството на уронови киселини беше доказано чрез HPLC.

9. Оценка на преживяемостта на ракови и нормални клетки чрез МТТ-тест

Използваните концентрации на гликолипиди и полизахариди, използвани в експериментите бяха следните: 10, 25, 50, 75 и 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$, приложени върху концентрация 1×10^5 клетки от съответния тип изпитвани клетки.

Жизнеспособността на клетките с новополучените биологичноактивни субстанции – два типа рамнолипиди и трехалозолипид и екзополисахаридите беше проследена чрез МТТ (3-(4,5-dimethylthiazol 2-yl)-2,5 dipheniltetrazoliumbromide) – тест [Cory et al., 1991].

9.1. Клетъчни линии и условия на култивиране

Всички клетъчни линии (MCF-10A, MCF-7 и MDA-MB-231) са от американската колекция от типови култури - ATCC (Манасас, Вирджиния, САЩ). Клетъчни линии на аденокарцинома на човешката гърда (MCF-7 - ниско метастатична и MDA-MB-231 - високо метастатична) са култивирани в Dulbecco's модифицирана среда на Eagle's (DMEM), допълнена с 10% фетален говежди серум (FBS), 1% натриев пируват, 1% MEM несъществени аминокиселини (NEAA) без антибиотици. Бяха включени и човешки туморни клетъчни линии Hela (карцином на шийката на матката), HT-29 (колоректален карцином).

Като контрола във всички експерименти, беше използвана нетуморигенната клетъчна линия на рак на гърдата (MCF-10A), която се култивира в DMEM среда.

9.2. Анализ на жизнеспособността на третираните клетки

Цитотоксичната активност на RL 1, RL 2, както и на TL върху култивираните клетки се измерва с МТТ (3- (4,5-диметилтиазол-2-ил) -2,5-дифенил тетразолиев бромид) колориметричен тест.

10. Изследвания със сканиращ електронен микроскоп (SEM)

Наблюдавани бяха синтезираните гелове с и без клетки. Интериорът и морфологията на геловете беше изследвана с помощта на Philips 515 сканиращ електронен микроскоп, работещ при 10-25 kV. Преди наблюденията криогеловите проби бяха фиксирани и покрити със злато за 60 s.

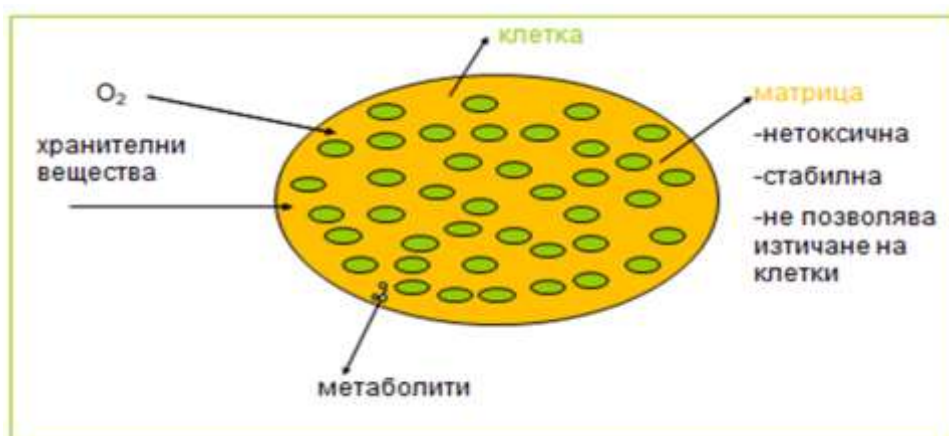
11. Флуоресцентна микроскопия

Морфологичните промени, предизвикани от тестваните проби от полизахариди в туморни клетки MCF-7, бяха анализирани чрез флуоресцентна микроскопия.

III. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Имобилизация на клетките от избрани бактериални щамове с цел увеличаване продукцията на гликолипиди

Клетките от *Pseudomonas aeruginosa* BN10 и *Rhodococcus wratislavensis* бяха имобилизирани *in situ* в биосъвместимите полиетилен оксидни (PEO) и полиакриламидни (РААm) криогелове. Първо, клетките бяха смесени с реагентите във водна среда и след това полимерната мрежа беше формирана с UV- светлина, която индуцира омрежване в замразено състояние.



Криогелите могат да бъдат синтезирани от полимери с ниска цена, използвайки много лесен метод. Те са супер макропорести с канали от взаимно свързани пори.

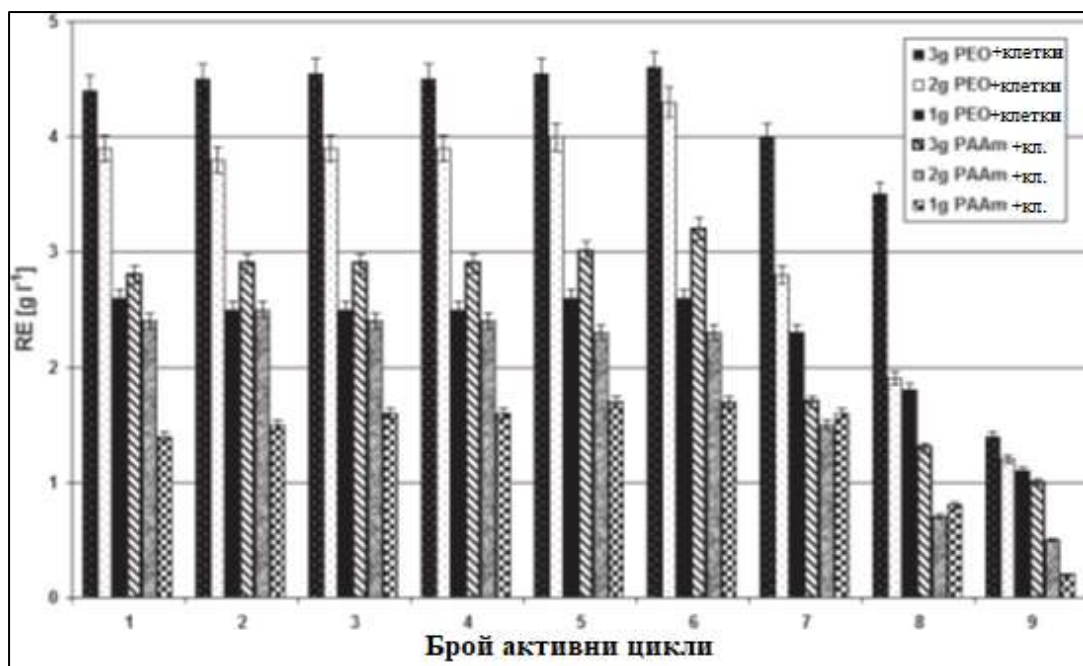
Важна характеристика е, че притежават уникална хетерогенна отворена пореста структура, която увеличава равновесните сорбционни свойства и позволява безпрепятствена дифузия на разтворени вещества, наночастици и микрочастици, способни да задържат големи количества вода, без да се разтварят. Благодарение на тези свойства и способността им да имитират биологичната среда, те са много ефективни за включване на живи, цели клетки [Savina et al., 2021].

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Правилният избор на матрица за имобилизация е важен и специфичен спрямо клетките за имобилизация поради това, че типа на матрицата и нейното количество оказва влияние на върху получената концентрация на гликолипиден биосърфактант от *Pseudomonas aeruginosa*, както и върху запазване действието на ензимните системи в клетката, нейната цялост и стабилност, както и възможността за многократно приложение.

Вариране на количеството матрица с имобилизирани клетки има своето значение за функционирането на имобилизираната система в процеса на синтез на желаното биологичноактивно вещество. Използването на три диска (3 g) от матрицата с имобилизирани бактериални клетки доведоха до най-висок биосърфактантен добив (4.6 g L^{-1} в 6-ия цикъл на работа). С използването на два диска, се получиха 4.3 g L^{-1} , и с един диск - значително намалена концентрация от 2.6 g L^{-1} . РЕО матрицата при избрания бактериален щам се оказа по-подходяща, защото използването и доведе до увеличен синтез на гликолипид (Фигура 10). Наблюдаваното увеличаване на производството на гликолипиди в среда с по-голямо количество на носителя вероятно е довело до увеличаване на дифузията на повърхността и следователно до по-добро снабдяване с кислород и трансфер на хранителни вещества. Експериментите продължиха с използване на 3 дискчета (3 g) с включени клетки от съответния щам за по-добра продукция на желаното вещество.

Имобилизираните препарати се оказаха с висока експлоатационна стабилност и действие. Активността се поддържа в продължение на 9 цикъла на действие, всеки от които обхваща 7 дни. За сравнение при повторение на отделните експерименти със свободни клетки се установи, че се извършва бързо намаляване на биосърфактантната продукция през 3-ия цикъл (Фигура 9).



Фигура 9. Брой активни цикли при използване на различно количество матрици (PEO), като L-рамнозата е изразена като еквиваленти на рамноза -RE [g L⁻¹].

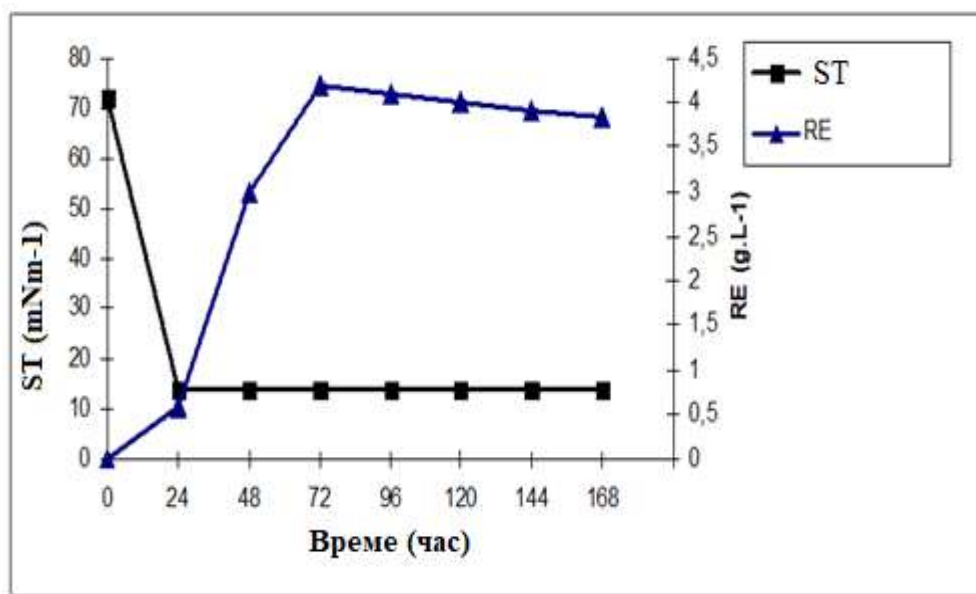
1.2. *Rhodococcus wratislavensis*

От щам *Rhodococcus wratislavensis* бяха изолирани и пречистени трехалозолипидни биосърфактанти. За оптимизиране на продукцията и в този случай беше използван методът на имобилизация. Най-подходяща се оказа криогелната матрица, синтезирана на основата на полиакриламид.

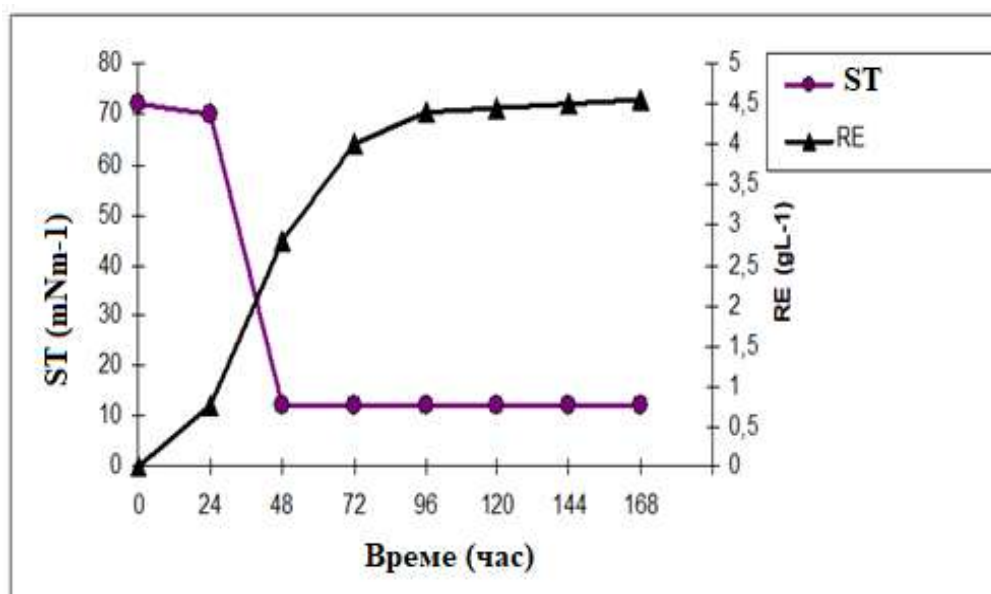
2. Кинетика на биосъфактантната продукция

Откриването на производството на биоповърхностно активно вещество се извършва чрез измерване на повърхностното напрежение –ST [mN m^{-1}].

Концентрациите на рамнолипид са изчислени от стандартни криви, приготвени с L-рамноза и изразени като еквиваленти на рамноза –RE [g L^{-1}].



Фигура 10. Повърхностно напрежение и синтез на рамнолипиди от *Pseudomonas aeruginosa* в свободна форма.



Фигура 11. Повърхностно напрежение и синтез на рамнолипиди от *Pseudomonas aeruginosa* в имобилизирана форма (криогелна матрица на основата на PEO).

По време на растежа на бактерията върху 2% глицерол, ST на средата намалява от 70 mN m^{-1} на $17,5 \text{ mN m}^{-1}$ при свободни клетки и до $10,8 \text{ mN m}^{-1}$ при използване на имобилизирани клетки на *Pseudomonas aeruginosa*. Този бърз спад на ST беше придружен от образуването на стабилни емулсии с керосин, и двете показващи производството на биосърфактант. Производството на рамнолипиди беше ниско през началните 24 часа, след което то се увеличи драстично, достигайки 4.5 g L^{-1} след 72 h (Фигура 10).

Кинетиката на производството на биоповърхностноактивно вещество от свободни и имобилизирани клетки бяха проследени в продължение на 7 дни в периодични експерименти с изследваните култури при оптимални условия.

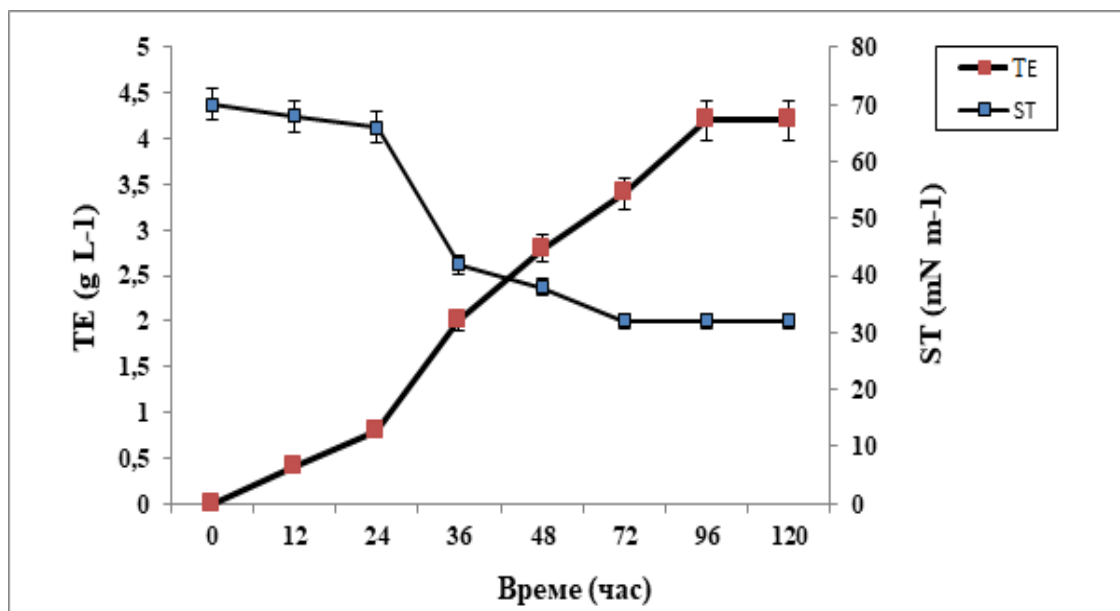
Бързото спадане на повърхностното напрежение беше придружено от формирането на стабилни емулсии на безклетъчната култура в бульон с керосин, като и двата параметъра показват производството на биосърфактант. Високи нива на рамнолипиди са наблюдавани в късна стационарна фаза, предполагаща, че биосърфактантът е произведен като вторичен метаболит.

По време на култивирането на *Pseudomonas aeruginosa* се получават 3.8 g L^{-1} от биосърфактанта за 7 дни при използването на свободни клетки на изследвания щам и 4.5 g L^{-1} , при използване на имобилизирани в РЕО криогел клетки на същия бактериален щам (Фигура 11).

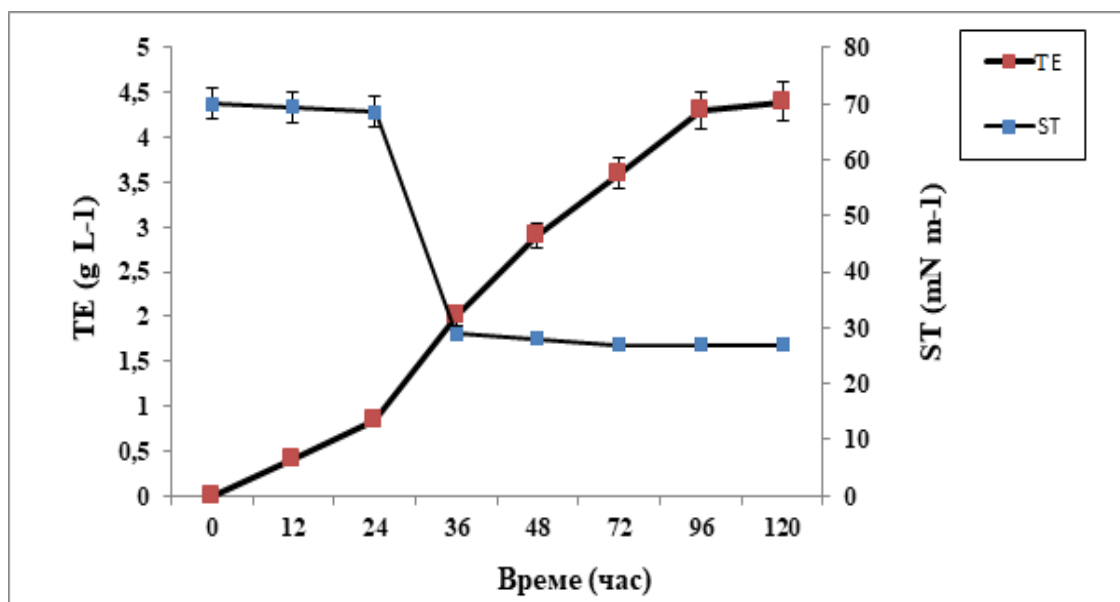
Киселинното утаяване и екстракция с етилацетат, разделяне и пречистване чрез хроматография бяха разделени две фракции моно-рамнолипид RL 1 и дирамнолипид RL 2 с подобни повърхностно активни свойства.

При използване метода на имобилизация за стимулиране на продукцията на гликолипидни биосърфактанти от клетки на *Rhodococcus wratislavensis*, също беше установено спадане на повърхностното напрежение от 70 mN m^{-1} , в случая на имобилизирани в РААм матрицата клетки, повърхностното напрежение на средата намалява след около 36 часа култивиране и достига на 72 час най-ниската стойност - $29,0 \text{ mN m}^{-1}$ (Фигура 12). Намаляване на повърхностно напрежение и образуване на стабилни емулсии са доказателство за получаването на биосърфактант и в този случай.

Продукцията повърхностноактивно вещество достига $4,5 \text{ g L}^{-1}$ за имобилизираните клетки (Фигура 13).



Фигура 12. Повърхностно напрежение и синтез на трехалозолипиди от *Rhodococcus wratislavensis* в свободна форма.



Фигура 13. Повърхностно напрежение и синтез на трехалозолипиди от *Rhodococcus wratislavensis* в имобилизирана форма (PAAm).

От получените резултати става ясно, че използването на този вид матрици при имобилизация е ефективен подход, който разчита на нетоксичността, достъпността, бързината и е универсален инструмент за повишаване на добива на рамнолипиди, с използване на лесна манипулация. По този начин, някои екологични и икономически въпроси биха могли да намерят своя отговор.

Добивът на рамнолипиди в имобилизираната система надвишава този на свободните бактериални клетки, дефинирайки един ефективен биопроцес. Подобно е поведението и на имобилизираните клетки на *Rhodococcus wratislavensis*, продуцент на трехалозолипид.

Екологичните и биологични свойства на рамнолипидите ги правят мощни материали за използване в терапевтични приложения. Рамнолипидите са известни, че индуцират апоптоза и по този начин могат да инхибират пролиферацията на раковите клетки. RL също могат да действат като имуномодулатори за регулиране на хуморалната и клетъчната имунна система [Thakur et al., 2021]. Поради тази причина, нашите изследвания продължиха в посока изпитване в търсене на потенциална антитуморна активност на синтезираните биологичноактивни вещества.

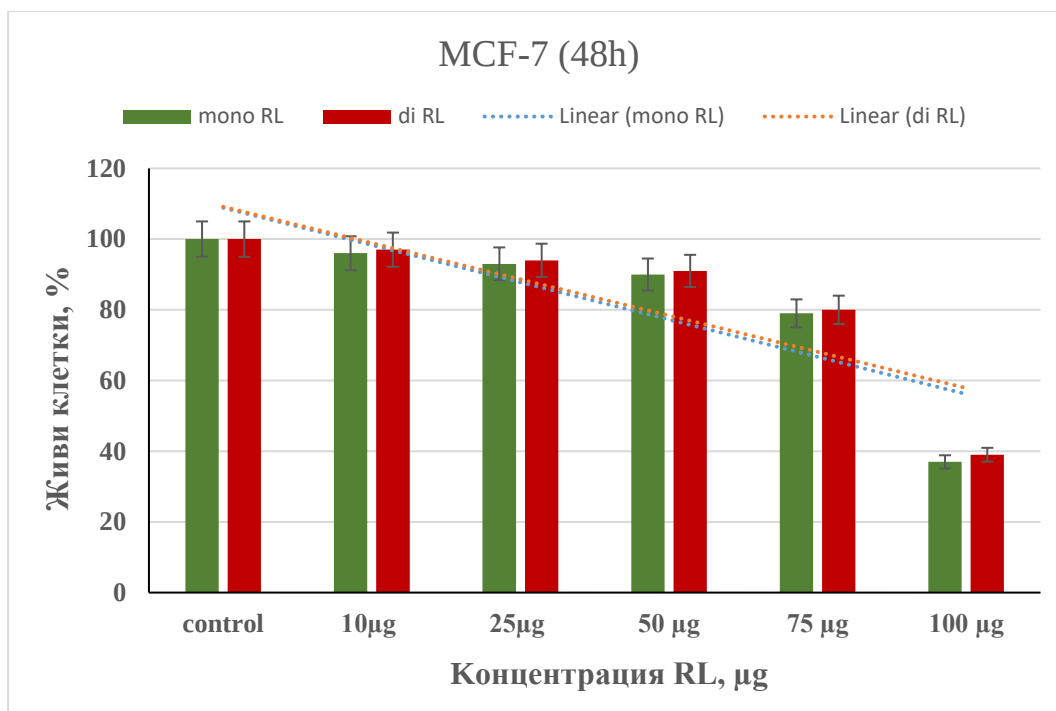
3. Изследване на антитуморния ефект на продуцираните от *Pseudomonas aeruginosa* BN10 RL-1 и RL-2

Проведено беше *in vitro* изследване на противораковата активност на моно- и ди-рамнолипиди (RL-1 и RL-2) срещу клетъчни линии на рак на гърдата при човека.

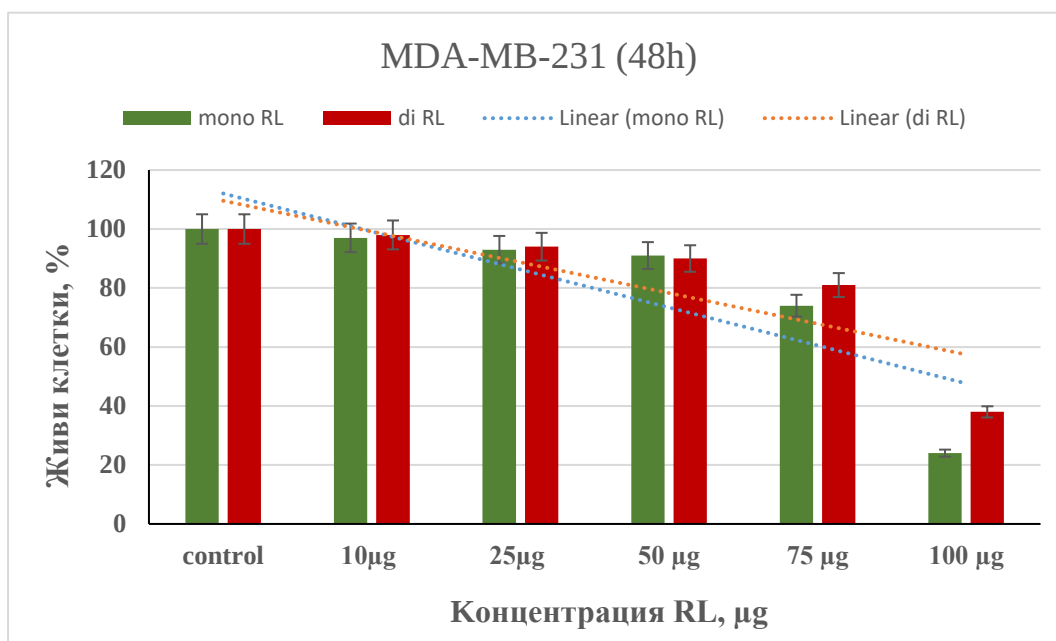
Изпитано беше антитуморното им действие върху две ракови клетъчни линии, както и върху нормални клетки. Установено е понижение в жизнеността в най-висока степен на клетките от високометастатичната линия MDA-MB 231.

Резултатите за MCF-10A клетки показват леко влияние върху клетъчната жизнеспособност и за двата прилагани рамнолипиди в сравнение с демонстрирания ефект върху раковите клетъчни линии, които показаха по-малка цитотоксичност на тестваните концентрации към неракови клетки, което е и най-добрият сценарий за противоракови приложения (Фигура 16).

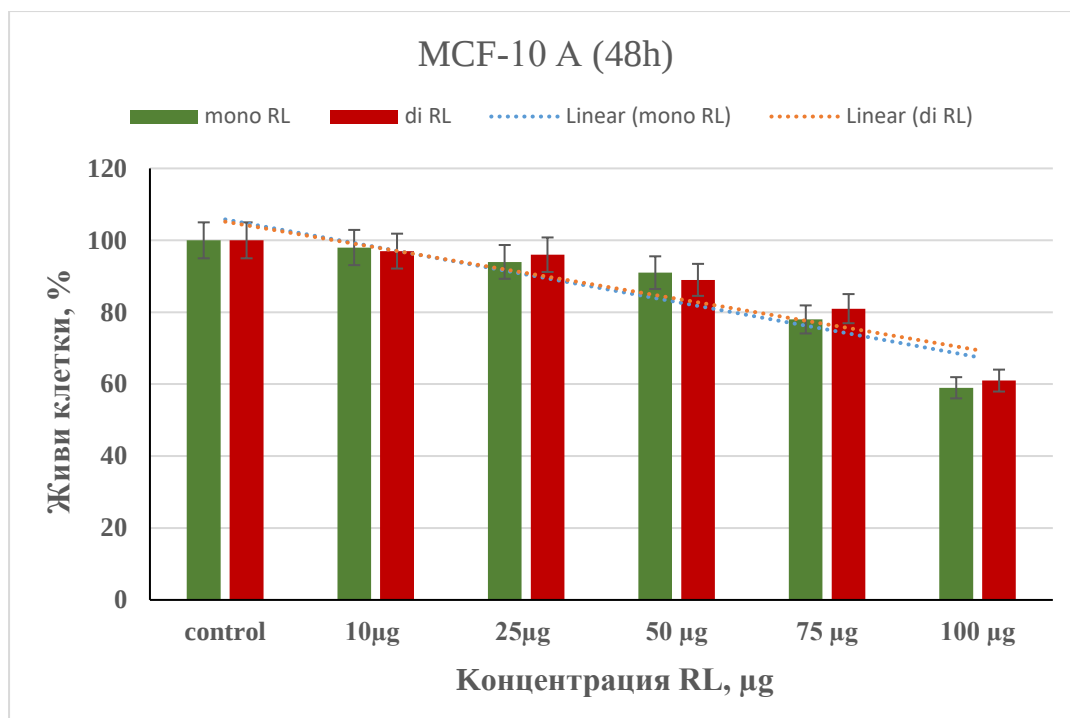
Нашите данни показват по - силен цитотоксичен ефект върху високо метастатичната линия MDA-MB-231 клетки (Фигура 15) в сравнение с ниско метастатичната линия MCF-7 (Фигура 14), както за RL-1, така и за RL-2.



Фигура 14. Преживяемост на третирана клетъчна линия MCF -7 с моно и ди-рамнолипидни биосърфактанти



Фигура 15. Преживяемост на третирана клетъчна линия MDA MB-231 с моно и ди-рамнолипидни биосърфактанти



Фигура 16. Преживяемост на третирана клетъчна линия MCF – 10 A с моно и ди-рамнолипидни биосъфактанти

Представените данни сочат, че моно-рамнолипидите са по-ефективни от ди-рамнолипидите. Съществува връзка между естеството на рака и нормалните клетки според химичния състав, чистота и нивото на намаляване на повърхностното напрежение на приложените рамнолипиди и тяхната ефективност [Rahimi et al., 2019].

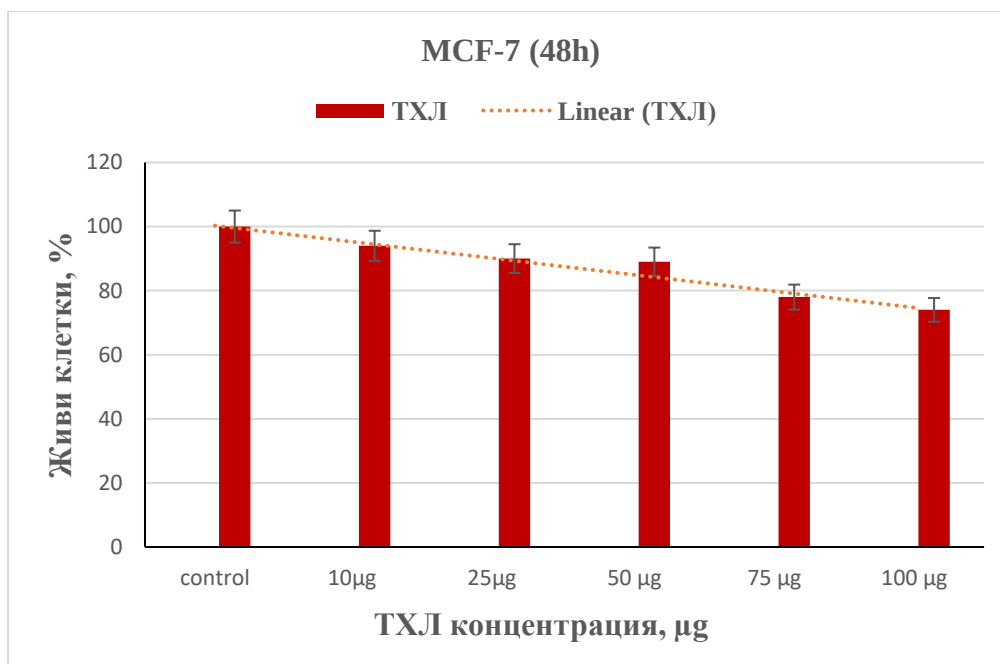
Въз основа на получените данни, можем да предположим, че демонстрираната разлика в действието на RL-1 и RL-2 е била поради по-силното взаимодействие с клетъчната повърхност, което води до по-голямо въздействие върху клетъчното оцеляване, както и в зависимост от разлики в метастатичния потенциал на изпитваните линии на рак на гърдата.

4. Изследване на антигуморния ефект на продуцираните от *Rhodococcus wratislaviensis* трехалозолипиди

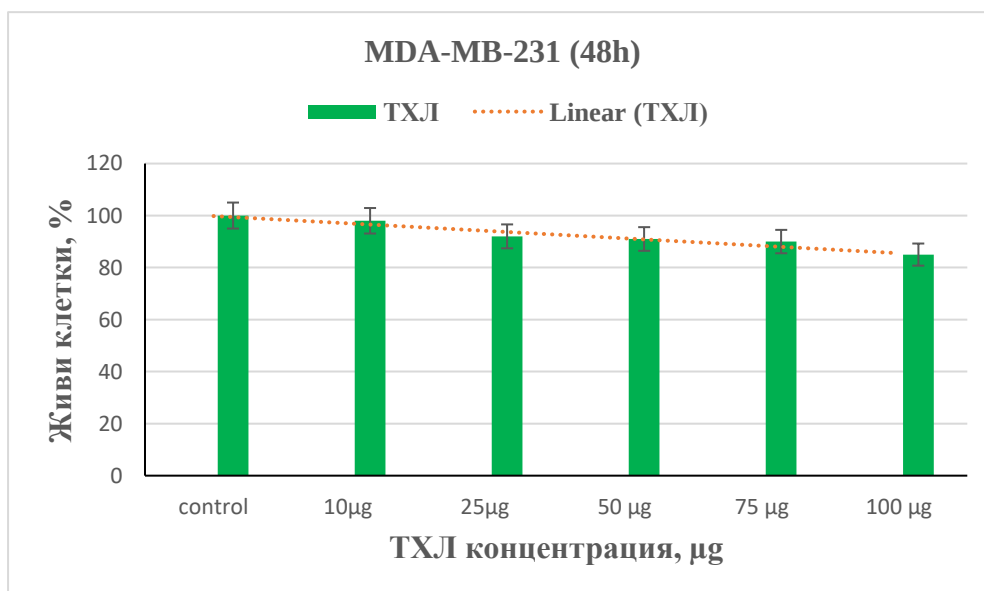
Трехалозо липидът е изолиран от щам *Rhodococcus wratislaviensis* и пречистен с течна хроматография. Ефектът от трехалозолипида върху жизнеспособността на клетките беше изпитан отново на двете клетъчни линии рак на гърдата (MCF-7 - ниско метастатична; MDA-MB231 - високо метастатична) и нормалната (MCF-10A) клетъчна линия. Промените в жизнеспособността на раковите клетъчни линии, индуцирани след третиране с трехалозолипида бяха проследени и се установи, че изолираното биологичноактивно вещество действа в зависимост от дозата и времето на експозиция (от 24-48 часа).

Изпробвахме противотуморния ефект на трехалозолипида, прилаган в различни концентрации (10–100 µg) за 24 и 48 часа срещу изпитваните клетъчни линии, като ефектът беше по-явен след 48 часа, както и срещу контролната неракова епителна клетъчна линия MCF-10A. Фигури 17, 18 и 19 показват клетъчната жизнеспособност, получена за всички клетъчни линии 48 часа след третирането. Отрицателните контроли (без третиране) са показани на фигурите като 100%. Както е показано във Фигура 17, най-високият ефект от третирането е открит за нискометастатичната клетъчна линия MCF-7, последван от високометастатичната MDA-MB-231 (Фигура 18) и почти никакъв ефект върху нормалната клетъчна линия MCF-10A (Фигура 19).

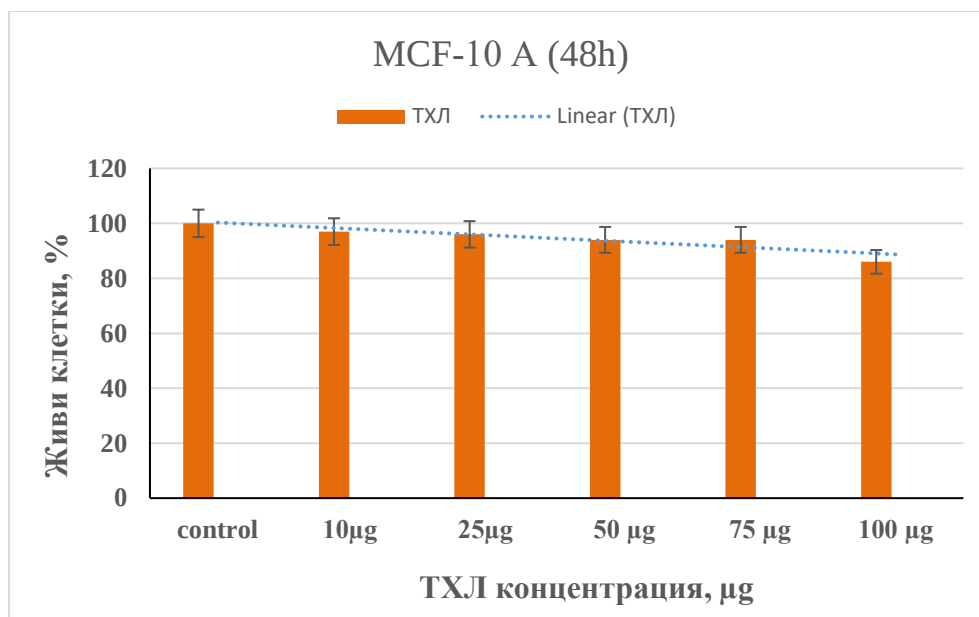
Този резултат се различава от обичайния, при който силно метастатичната клетъчна линия MDA-MB231 е обикновено по-силно повлияна.



Фигура 17. Брой жизнеспособни клетки след третиране с трехалозни липиди (TXL), представени като процент от контролните (нетретирани) клетки, анализирани чрез МТТ анализ.



Фигура 18. Брой жизнеспособни клетки след третиране с трехалозни липиди (TXL), представени като процент от контролните (нетретирани) клетки, анализирани чрез МТТ анализ.



Фигура 19. Брой жизнеспособни клетки след третиране с трехалозни липиди (TXL), представени като процент от контролните (необработени) клетки, анализирани чрез МТТ анализ.

Представените данни са след 48 часа инкубация. Всички данни са средно $\pm$ SD от три независими експеримента. Всички резултати са статистически значими спрямо контроли при съответно време на инкубация (p-стойност 0,05). Данните от сравнението на раковите клетъчни линии също се изчислява като статистически значим резултат (p-стойност $<0,01$).

Резултатите показват намаляване на процента жизнеспособни клетки с увеличаване на концентрациите на трехалозолипид и време на експозиция, като по този начин се предполага цитостатичен / цитотоксичен ефект на трехалозен липид върху третираните ракови клетъчни линии. Интересно е да се отбележи, че жизнеспособността на нормалната клетъчна линия MCF-10A, е до 100%. Такава зависимост се наблюдава и след третирането с TL при концентрации от 75 µg и 100 µg за 48 часа, където намаляването на степента на оцеляване е относително ниска (съответно 10% –20%). Освен това липсата на силно влияние върху скоростта на оцеляването на нормални клетки и от друга страна намаляване на жизнеспособността на раковите клетки, но не повече от 45%, е много обещаващ

резултат за бъдещи проучвания и приложения на TL в химиотерапията, например в комбинация с конвенционални противоракови лекарства.

5. Продукция на екзохетерополизахариди от червени микроводорасли

Като важна част от морските екосистеми, водораслите са едни от най-изобилните и потенциално възобновяеми ресурси, които притежават висока хранителна стойност и техните полизахариди имат разнообразна биологична активност [Zhao et al., 2018].

Екзополisahаридите представляват ценно метаболитно съединение, синтезирано от червени микроводорасли, които са нетоксични естествени агенти и могат да се прилагат и като имуностимуланти [Risiani et al., 2021] или богати на полизахариди екстракти, получени от определени видове медицински гъби, са показали противотуморни ефекти в различни експериментални модели [Roca-Lema et al., 2019].

Полизахаридите, синтезирани от щамове *Porphyridium* и *Rhodella*, са екзополisahариди, върху които е насочен нашия научен интерес. Те образуват полизахаридна капсула около клетката. Част от него се освобождава в средата (Фигура 20 и 21).



Фигура 20. *Porphyridium cruentum*



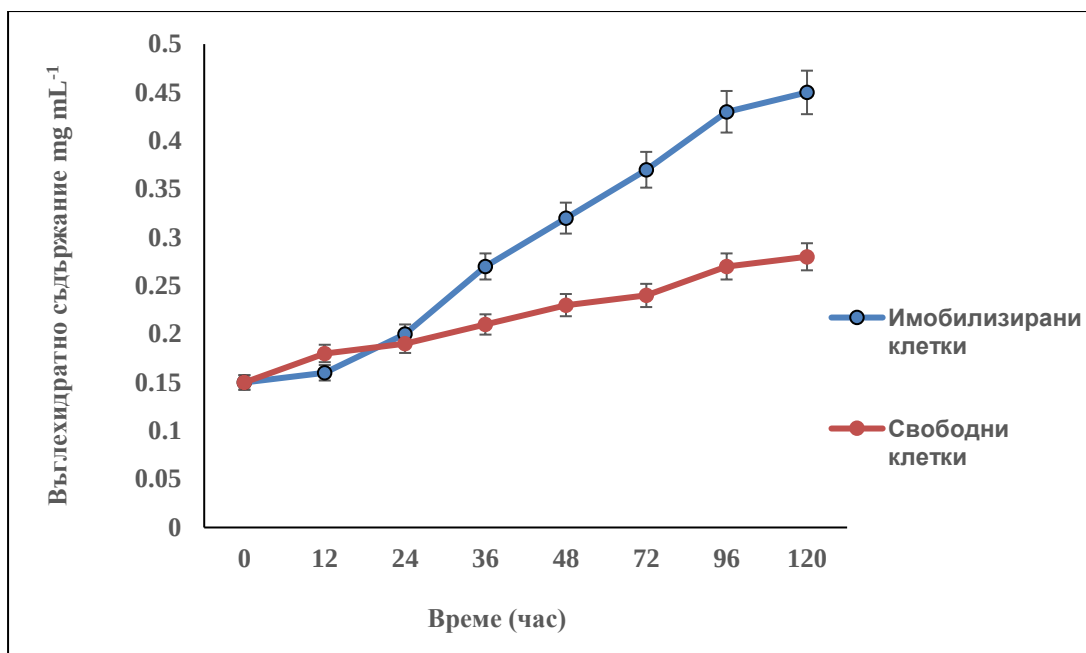
Фигура 21. Изображение на *Rhodella reticulata*

Сулфатните полизахариди съдържат сулфатни естерни групи в техните захарни остатъци, които са общи компоненти на широк спектър от макро и микроводорасли. Техните химични структури варират в зависимост от вида на водораслите и процедурата за извличане. Съществуват данни за антипролиферативната активност в ракови клетъчни линии *in vitro* на сулфатирани хетерополизахариди, както и инхибиторни свойства върху туморния растеж при мишки [Ye et al., 2008].

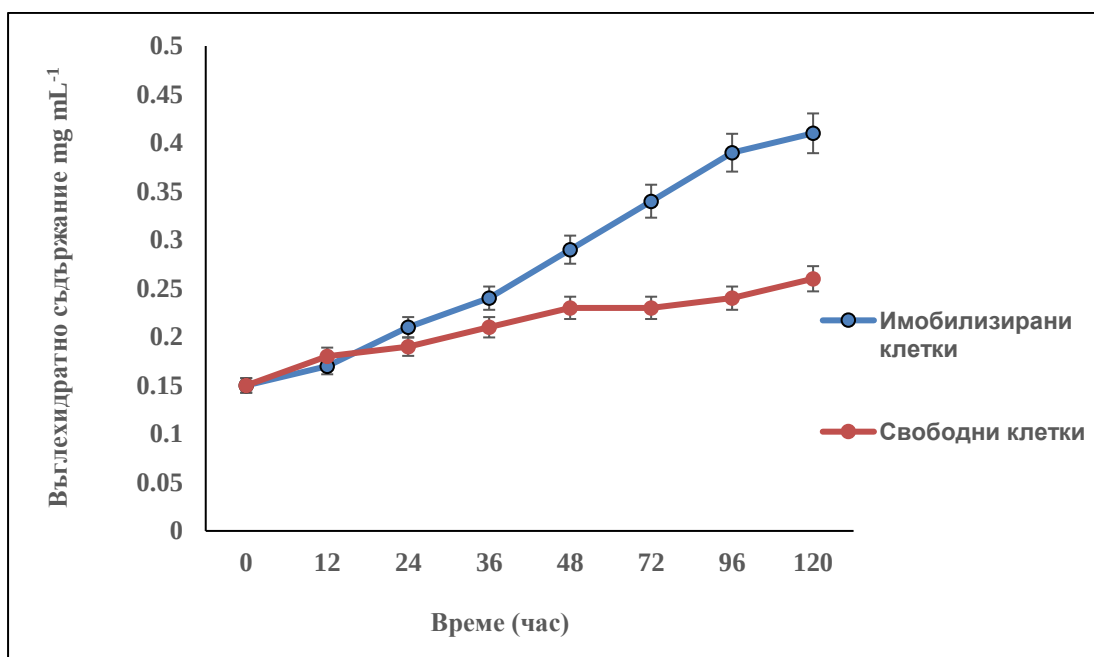
6. Оптимизиране на производството на екзохетерополизахариди чрез имобилизация

Извършено е интензивно култивиране и е проследен ефекта от включване на имобилизационна процедура върху биохимичното производство на културата от микроводорасли към подобряване синтеза на екзополisahариди.

Производството на водораслов полизахарид от клетките, включени в матриците, синтезирани на основата на НЕС показват забавена в началото продукция, която се засилва и достига 1,6 и 1,5 пъти по-високи стойности за имобилизираните клетки и при двата изследвани щама (Фигури 22 и 23).



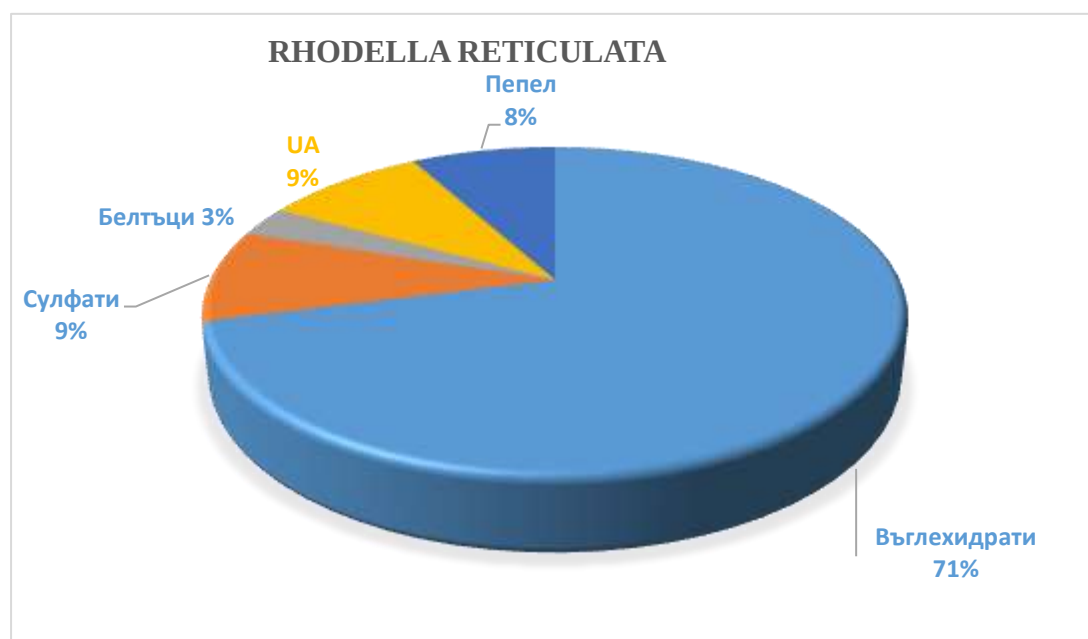
Фигура 22. Производство на екстрацелуларен полизахарид от *Porphyridium cruentum* в свободна и имобилизирана форма.



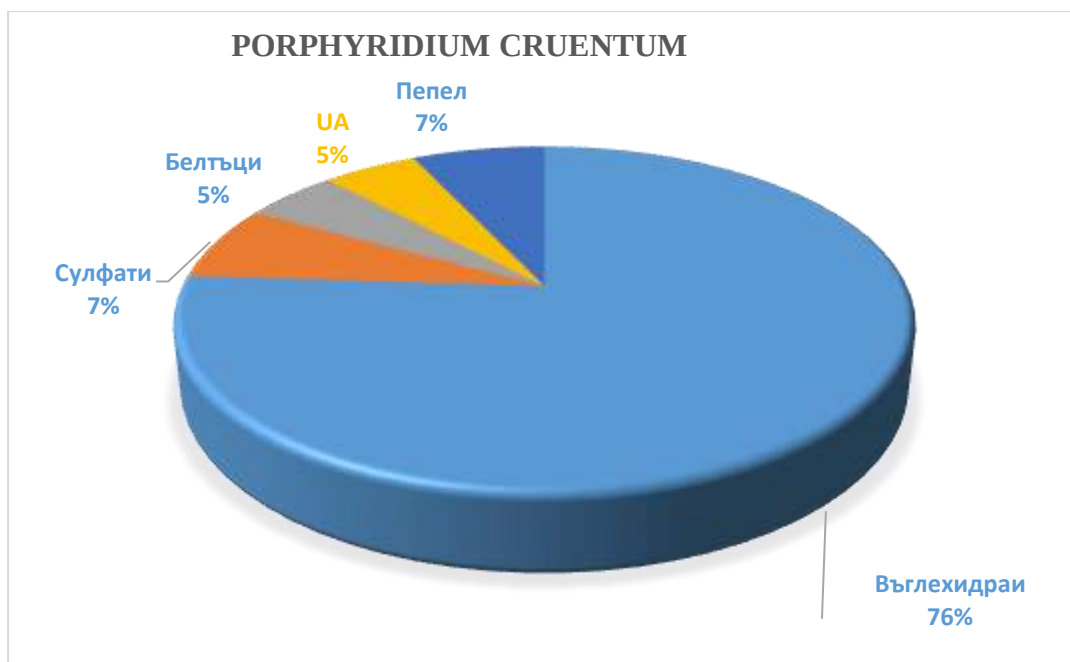
Фигура 23. Производство на екстрацелуларен полизахарид от *Rhodella reticulata*

7. Състав на водорасловите полизахариди

Анализът на въглехидратите се извършва в суспензия за оценка на общото количество полизахариди. Количеството въглехидрати и сулфати показва близки стойности за двата изследвани щама, по -високи за *Porphyrodium cruentum*. В суровата суспензия на *Porphyridium cruentum* и *Rhodella reticulata* също присъстват ниски количества пепел и протеини. Сходството в състава води до сходство и в свойствата на двата изследвани полизахарида (фигура 24 и фигура 25).



Фигура 24. Химичен състав на хетерополизахарид от *Rhodella reticulata*



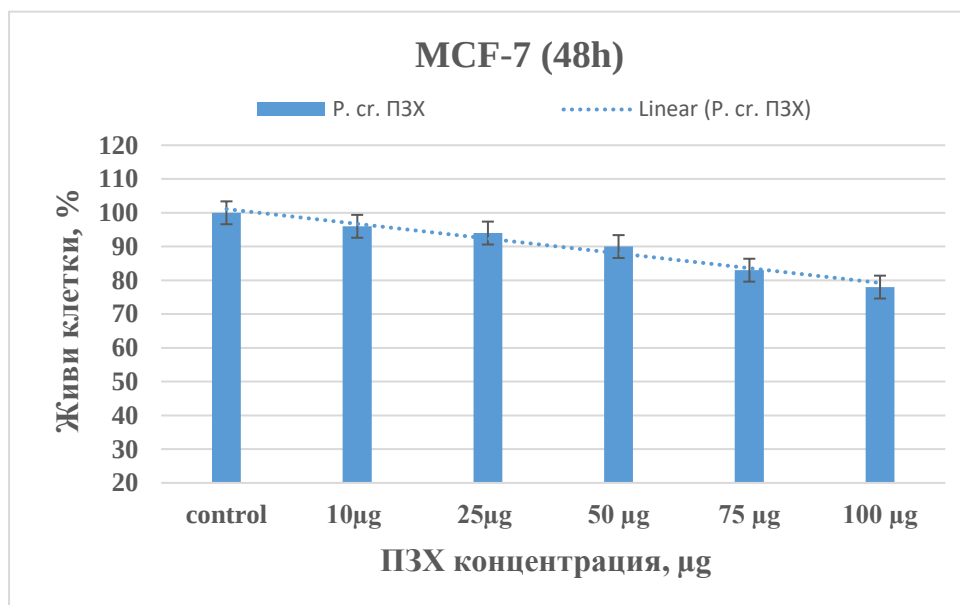
Фигура 25. Химичен състав на екзополизахарид от *Porphyridium cruentum*

8. Изследване потенциала на изолираните биологичноактивни вещества върху туморни и нормални клетъчни линии в *in vitro* експерименти

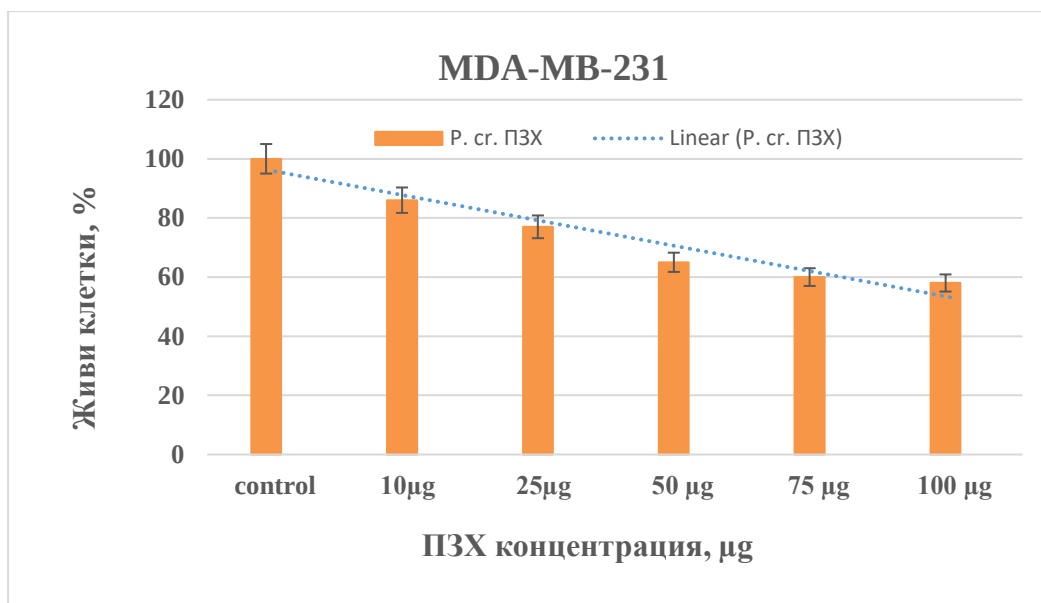
Микроводорасловите сулфатни екзополизахариди притежават потенциал за приложение като цитотоксични агенти, така че нашите изследвания продължиха с оценка на потенциала за лечение на туморни клетъчни линии чрез получените от микроводораслите хетерополизахариди, поставяйки предизвикателството за прилагането на тези биопродукти като противотуморни агенти.

Инхибирането на клетъчната пролиферация на клетъчни линии: високо метастатична MDA-MB 231, ниско метастатична MCF-7 и нормална MCF-10A от тестваните биоактивни вещества от червени микроводорасли беше оценено. Ефектът е зависим от дозата. Извършеният тест за жизнеспособност показва, че при концентрация 50 µg/ml ПЗХ от *Porphyridium cruentum* върху високо метастатичната клетъчна линия MDA-MB 231, регистрираното инхибиране е 35%, а при 75 µg/ml е 40% - Фигура 27. За ниско метастатичната клетъчна линия MCF -7 ефектът на инхибиране е по -слабо изразен - до 30%, като се използва концентрация от 75 µg/ml – Фигура 26.

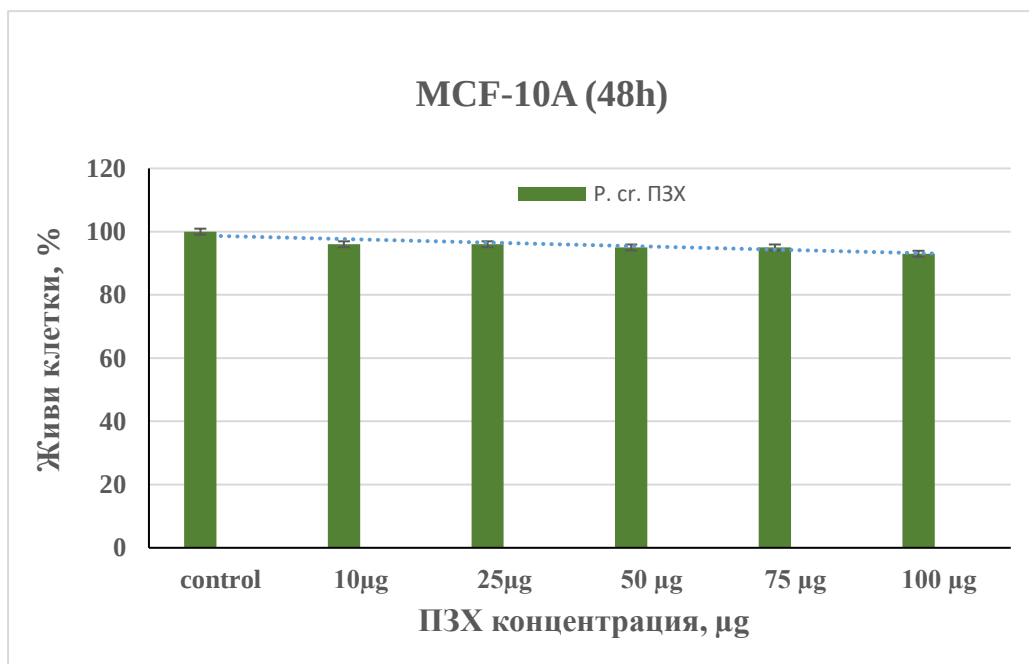
Инхибирането на клетъчната пролиферация на клетъчни линии с метастатични MDA-MB 231, MCF-7 и нормална MCF-10A от изолирания от червеното микроводорасло *Rhodella reticulata* екзополизахарид също показва, че ефектът е зависим от дозата. По -високите концентрации доведоха до 44% намаление на жизнеспособността за линия MDA -MB 231 - Фигура 27 и 20% намаление на жизнеспособността за ниско метастатична линия (Фигура 26).



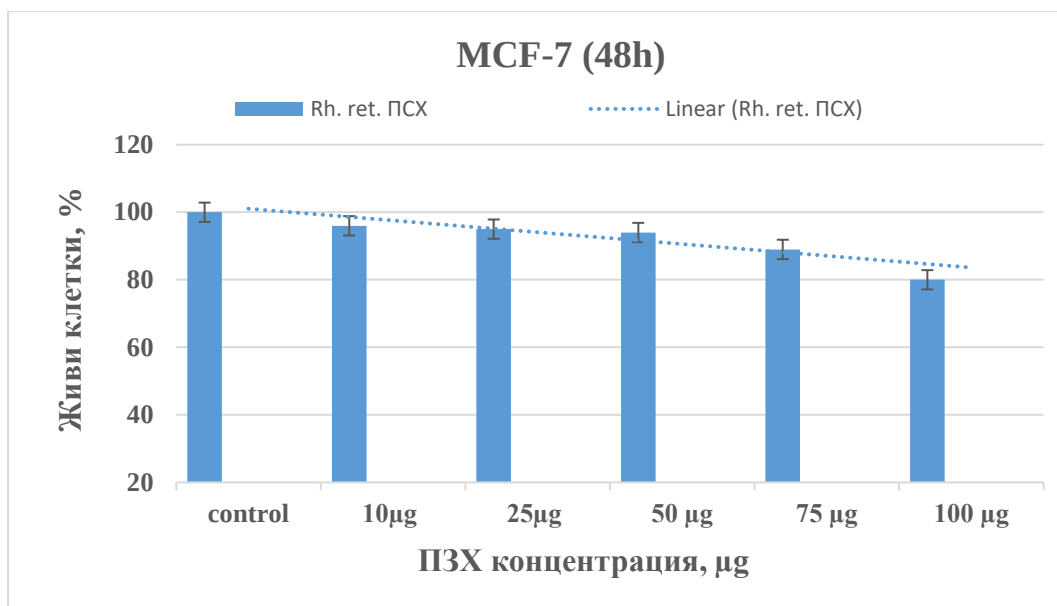
Фигура 26. Брой жизнеспособни клетки след третиране с ПЗХ от *Porphyridium cruentum*, представени като процент от контролните (нетретирани) клетки, анализирани чрез МТТ анализ.



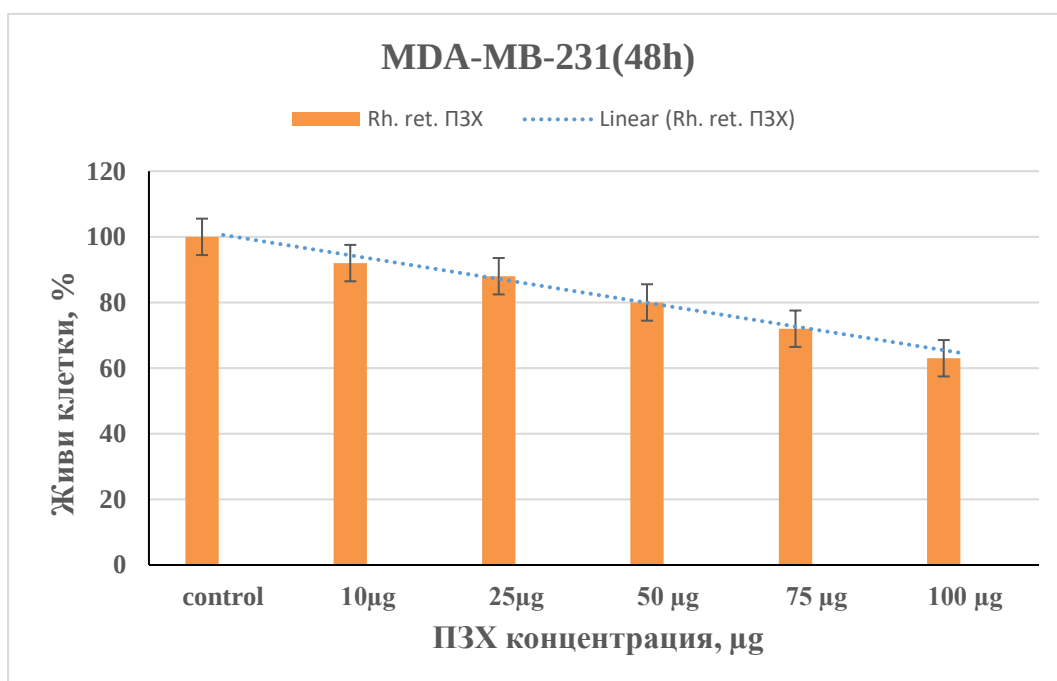
Фигура 27. Брой жизнеспособни клетки след третиране с ПЗХ от *Porphyridium cruentum*, представени като процент от контролните (нетретираните) клетки, анализирани чрез МТТ анализ.



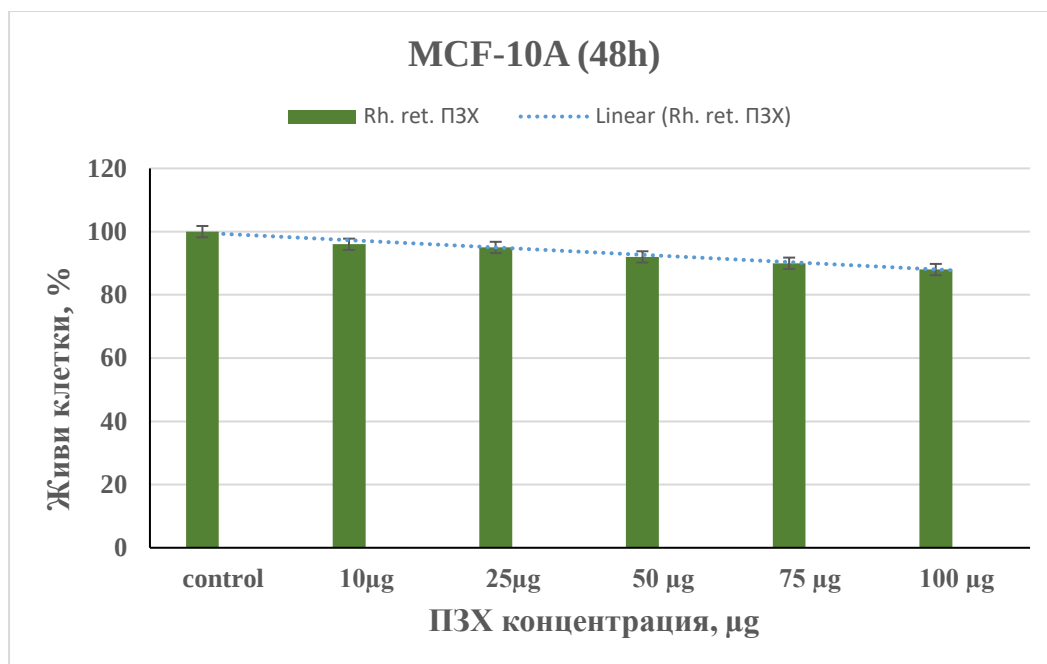
Фигура 28. Брой жизнеспособни клетки след третиране с ПЗХ от *Porphyridium cruentum*, представени като процент от контролните (нетретираните) клетки, анализирани чрез МТТ анализ.



Фигура 29. Брой живи клетки след третиране с ПЗХ от *Rhodella reticulata*, като процент от контролните (нетретираните) клетки, анализирани чрез МТТ-тест



Фигура 30. Брой живи клетки след третиране с ПЗХ от *Rhodella reticulata*, като процент от контролните (нетретираните) клетки, анализирани чрез МТТ-тест



Фигура 31. Брой живи клетки след третиране с ПЗХ от *Rhodella reticulata*, като процент от контролните (нетретираните) клетки, анализирани чрез МТТ-тест

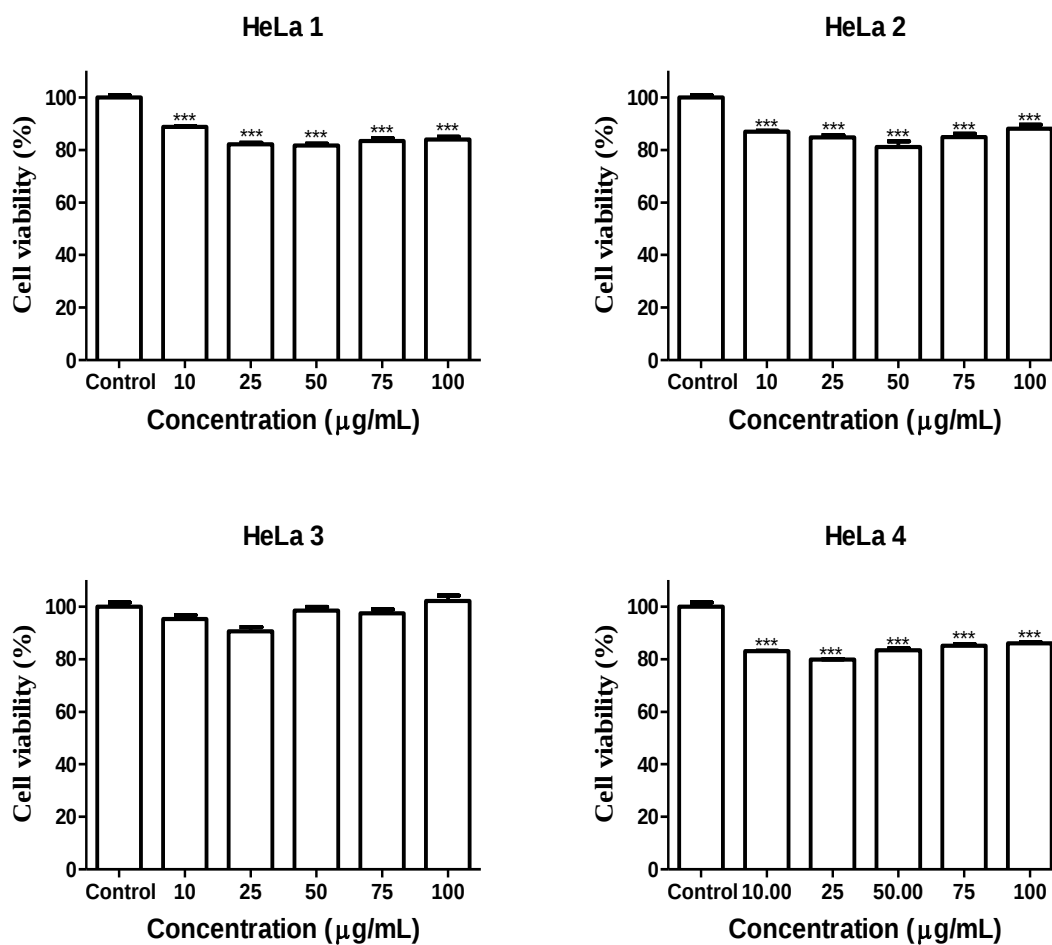
Има малко информация относно антикарциногенните свойства на полизахаридите от морски микроводорасли, въпреки че тези организми се използват дълго време като храна за хората, особено *Porphyridium*. Инхибиране на клетъчната пролиферация на клетъчни линии: ниско метастатична MDA-MB 231, високо метастатична MCF-7 и нормална MCF-10A от изолацията от червени микроводорасли екзополisahариди се установиха в нашите експерименти.

Полизахаридът, синтезиран и отделен в заобикалящата среда от червеното микроводорасло при нашите експерименти, показва обещаващи свойства като антиканцерогенен агент. Извършеният тест за жизнеспособност (MTS), показва силен ефект на изолираните полизахариди при концентрация (75 µg / ml) върху високо метастатичната клетъчна линия на рак на гърдата MCF-7 и почти никакъв инхибиторен ефект върху нормалната клетъчна линия.

9. Изследване потенциала на изолираните биологичноактивни вещества след претретиране с микровълни (400 W) върху туморни и нормални клетъчни линии в *in vitro* експерименти

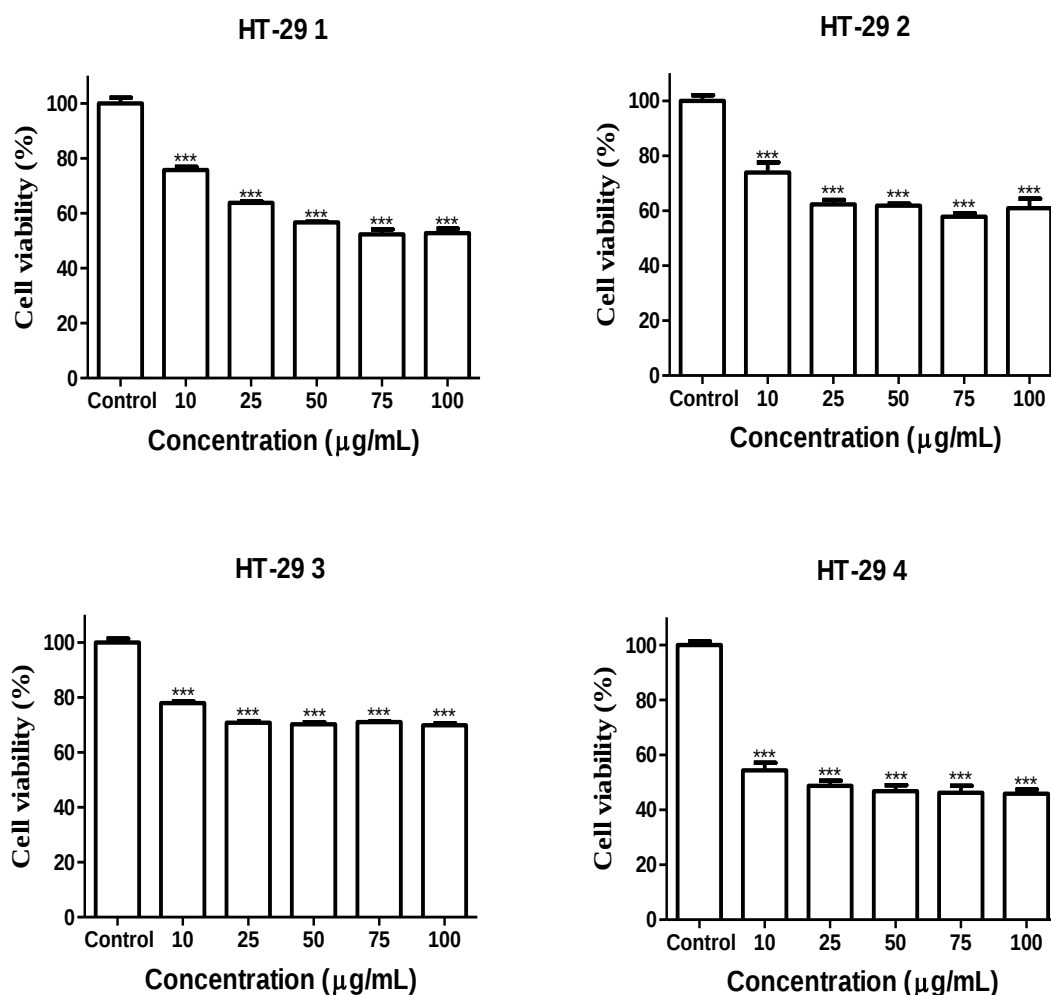
Изследванията ни се задълбочиха с включване в експериментите и претретирането на екзополизахарида от *Porphyridium cruentum* с микровълни (400 W) за два времеви интервала 3 минути и 2x3 минути. *In vitro* цитотоксичната активност беше оценена в панел от човешки ракови клетъчни линии. Проба 1 показва по-висока активност към всички тествани клетъчни линии и е подложена на предварителна обработка.

От получените резултати се установи, че полизахаридни проби 1, 2 и 4 индуцират статистически значимо намаляване на клетъчната жизнеспособност на клетките от карцином на шийката на матката HeLa при всички изпитвани концентрации. Стойностите на клетъчната жизнеспособност варират между 88,71% и 79,77%. Третирането с проба 3 не повлиява значително жизнеспособността на тестваната туморна клетъчна линия (Фигура 32).



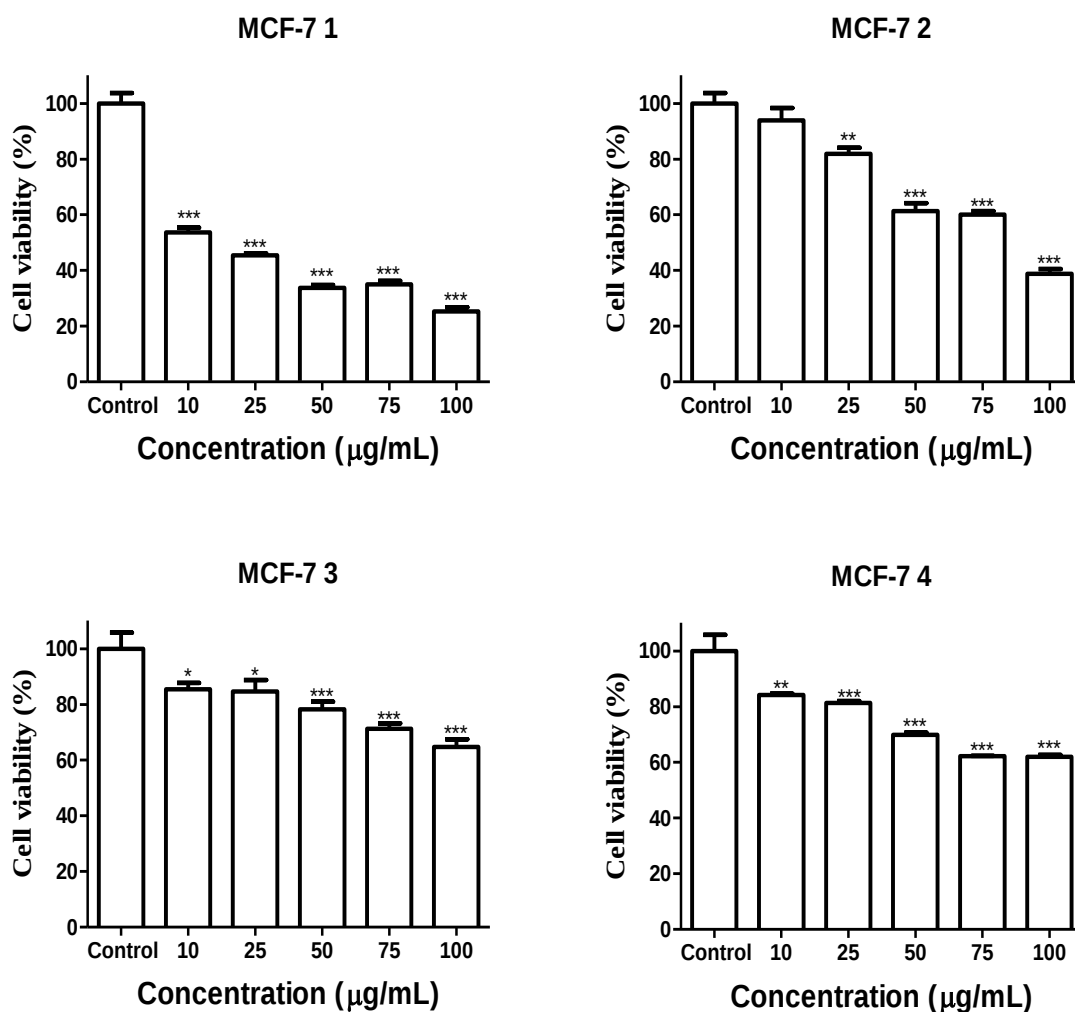
Фигура 32. Клетъчна жизнеспособност след третиране с различните проби (1-4) от полизахарида от червеното микроводорасло *Porphyridium cruentum* върху клетъчна линия HeLa. Стойностите на * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ и *** $p < 0.001$ се считат за статистически значими.

Изпитваните полизахаридни проби значително намаляват жизнеспособността и пролиферацията на клетките от карцином на дебелото черво HT-29. Проба 4 показва най-висока активност с най-ниски стойности на клетъчна жизнеспособност, достигащи до 45,91% в сравнение с контролата. Проба 1 също предизвиква значително намаляване на жизнеспособността на туморните клетки с най-ясно изразена дозова зависимост на наблюдаваните ефекти (Фигура 33).



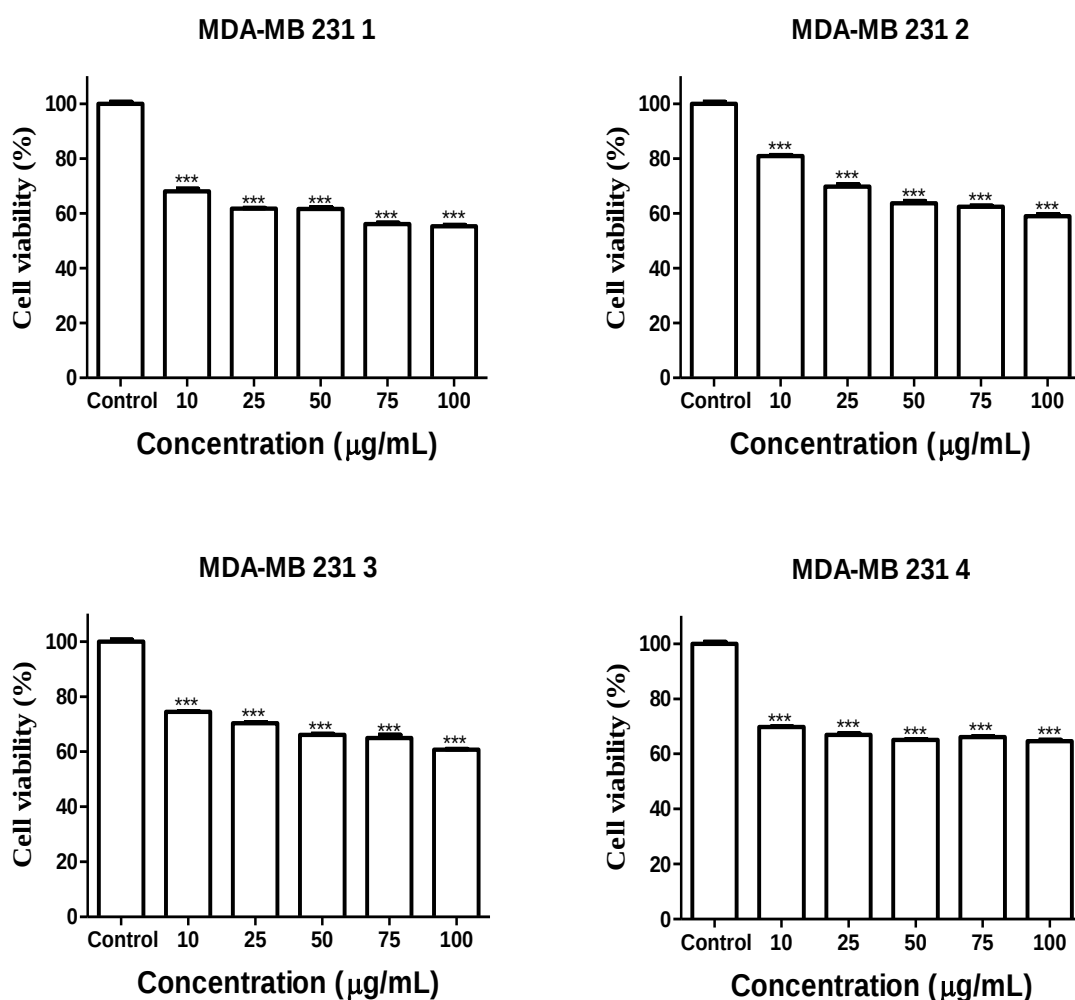
Фигура 33. Жизнеспособност на клетките след третиране с различните проби (1-4) от полизахарида, получен от червеното микроводорасло *Porphyridium cruentum* върху клетъчна линия HT-29. Стойностите на * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ и *** $p < 0.001$ се считат за статистически значими.

В клетъчната линия MCF-7 всички тествани проби показват значителни и зависими от дозата антипролиферативни и цитотоксични ефекти. Проба 1 е най-активната сред тестваните проби и намалява жизнеспособността на туморните клетки до стойности, вариращи от 53,65% до 25,37% (Фигура 34).



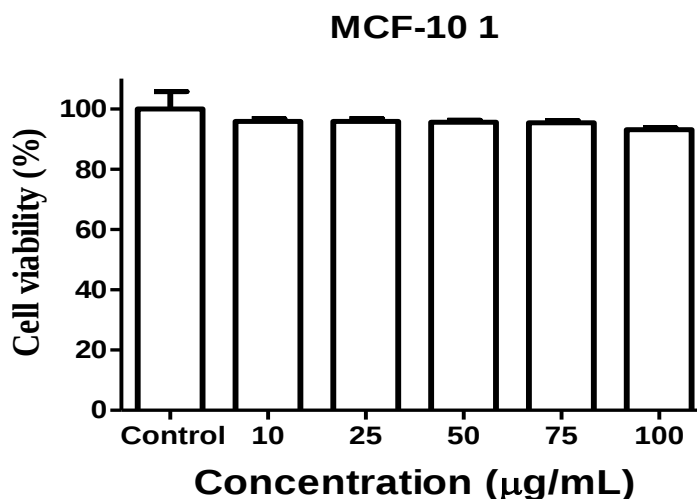
Фигура 34. Жизнеспособност на клетките след третиране с различните проби (1-4) от полизахарида, синтезиран от червеното микроводорасло *Porphyridium cruentum* върху клетъчна линия MCF-7. Стойностите на * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ и *** $p < 0.001$ се считат за статистически значими.

Тройно негативната клетъчна линия на аденокарцином на млечната жлеза MDA-MB-231 изглежда е по-малко чувствителна към цитотоксичните и антипролиферативни ефекти на тестваните полизахариди в сравнение с естроген-зависимата клетъчна линия на аденокарцином на гърдата MCF-7. Най-ниската стойност на клетъчната жизнеспособност (55,34%) е установена след третиране със 100 µg/mL от проба 1 (Фигура 35).



Фигура 35. Клетъчна жизнеспособност след третиране с различните проби (1-4) от полизахарида образуван от червеното микроводорасло *Porphyridium cruentum* върху клетъчна линия MDA-MB-231. Стойностите на * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ и *** $p < 0.001$ се считат за статистически значими.

Тъй като проба 1 показва по-висока активност спрямо всички изпитвани клетъчни линии, нейният ефект е тестван върху женска клетъчна линия на млечната жлеза MCF – 10A за сравнение с туморните клетъчни линии (фиг. 36). Регистрира се много слабо намаление на клетъчната жизнеспособност (7%).



Фигура 36. Жизнеспособност на клетките след третиране с полизахарид от червеното микроводорасло *Porphyridium cruentum* върху клетъчна линия MCF-10A.

Очакваше се прилагането на микровълни да разгради фракция 1 до по-къси олигозахариди и по този начин да подобри тяхната биологична активност, тъй като полизахаридите с дълга верига предполагат висок вискозитет и лоша разтворимост, така че полизахаридите трудно преминават през мембраните и влизат във вътрешността на клетката [Geresh et al., 2002]. Такъв феномен е наблюдаван и в това изследване. Доказахме, че предварително обработеният полизахарид проявява по-висока цитотоксична активност спрямо тестваните клетъчни линии след 3 минути предварителна обработка с микровълни. Вероятно по-продължителното третиране с микровълни (2x3 min), не е довело до повишена, а намалена биоактивност (проба 3). Този факт може да се обясни с нарушаване на структурата. Три минути експозиция изглежда са достатъчни за стимулиране на цитотоксичния ефект, или чрез получаване на по-къси олигозахаридни структури, или чрез освобождаване на сулфатни групи. След определяне на съдържанието на суфати, най-висока стойност

е получена за проба 4 -9, 21%, следвана от проба 1-7, 2%, което може да се обясни с важността на сулфатите за проява на биоактивност.

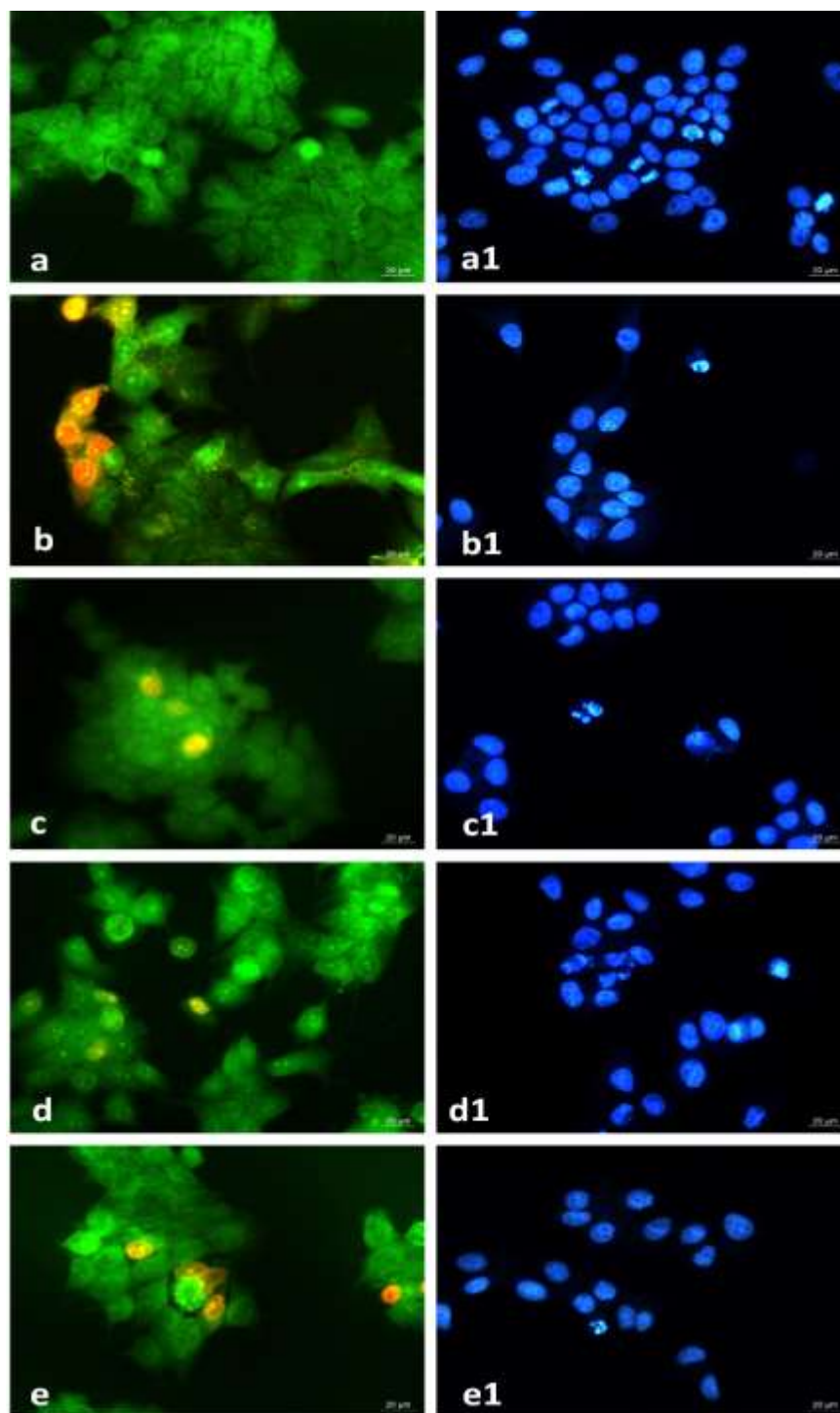
Резултатите на някои автори показват същото, тъй като по-високата противотуморна активност на сулфатните полизахариди може да бъде свързана с тяхното молекулно тегло и съдържание на сулфати [Dai-Hung and Se-Kwon, 2013]. От получените резултати се вижда, че всички тествани проби, третирани с полизахарид *Porphyridium cruentum* в концентрационен диапазон от 10 до 100 µg/mL, показват значителен и зависим от дозата антипролиферативен и цитотоксичен ефект.

Както в получените от нас резултати, така и по литературни данни е ясно, че водораслите произвеждат разнообразен набор от съединения и химикали, които улесняват тяхното оцеляване и метаболизъм в изключително тежка и конкурентна среда. Изследванията на естествените и уникални биоактивни съединения, получени в резултат на биосинтеза им на вторични метаболити, генерират нов интерес във фармацевтичната индустрия. Тяхното биоразнообразие и биоразпределение ги правят уникални по химичен състав и минерално съдържание. Следователно те са обещаващ източник на различни терапевтични биоактивни вещества за лечение на различни заболявания, включително рак.

10. Цитоморфологични изследвания

Раковите клетки избягват нормалната апоптоза, продължават да се размножават, пречат на нормалните тъкани или органи и причиняват увреждане на тялото или дори смърт. Следователно индуцирането на апоптоза винаги е било един от точните подходи за инхибиране на рака [Milisav et al., 2017].

Морфологичните промени, предизвикани от третиране с 50 µg/mL полизахариди в MCF-7 туморни клетки, бяха анализирани чрез флуоресцентна микроскопия след оцветяване с АО/ЕВ. Акридин оранж (АО) оцветява както живи, така и мъртви клетки, излъчвайки силна зелена флуоресценция, в резултат на интеркалацията в двуверижната ДНК. За разлика от АО, EtBr може да навлезе само в мъртви и късни апоптотични клетки с лоша мембранна цялост, така че оцветява всички мъртви клетки, за да генерира червена флуоресценция. Ранните апоптотични клетки се характеризират с яркозелено ядрено оцветяване и хроматинова кондензация под формата на плътни зелени области, а късните апоптотични клетки са с оранжево ядро с хроматинова кондензация. Контролите (нетретирани MCF-7 туморни клетки) показват нормална морфология и монослоен растеж. Клетките бяха с многоъгълна форма и равномерно зелено оцветяване (Фигура 37a).



Фигура 37. Морфологични промени в MCF-7 туморни клетки, третирани с полизахаридни проби (50 $\mu\text{g/mL}$) за 48 часа. а, а1 – контролни клетки; b, b1 – клетки, третирани с проба 1; c, c1 – клетки, третирани с проба 2; d, d1 – клетки, третирани с проба 3; e, e1 – клетки, третирани с проба 4; а, b, c, d, e – АО/ЕВ оцветяване; а1, b1, c1, d1, e1 – DAPI оцветяване.

Инкубацията с полизахаридни проби предизвиква промени както в растежа, така и в морфологията на MCF-7 клетките. Клетъчният монослой е повреден, клетки с овална форма, с ярко жълто-зелено ядро с хроматинова кондензация, видими като плътни зелени области (ранни апоптотични клетки) и клетки с оранжево-червено оцветяване, кондензация и маргиниране на хроматина или фрагментирано ядро, бяха наблюдавани и образуваните апоптотични тела (късни апоптотични клетки) - (Фигура 37b-e).

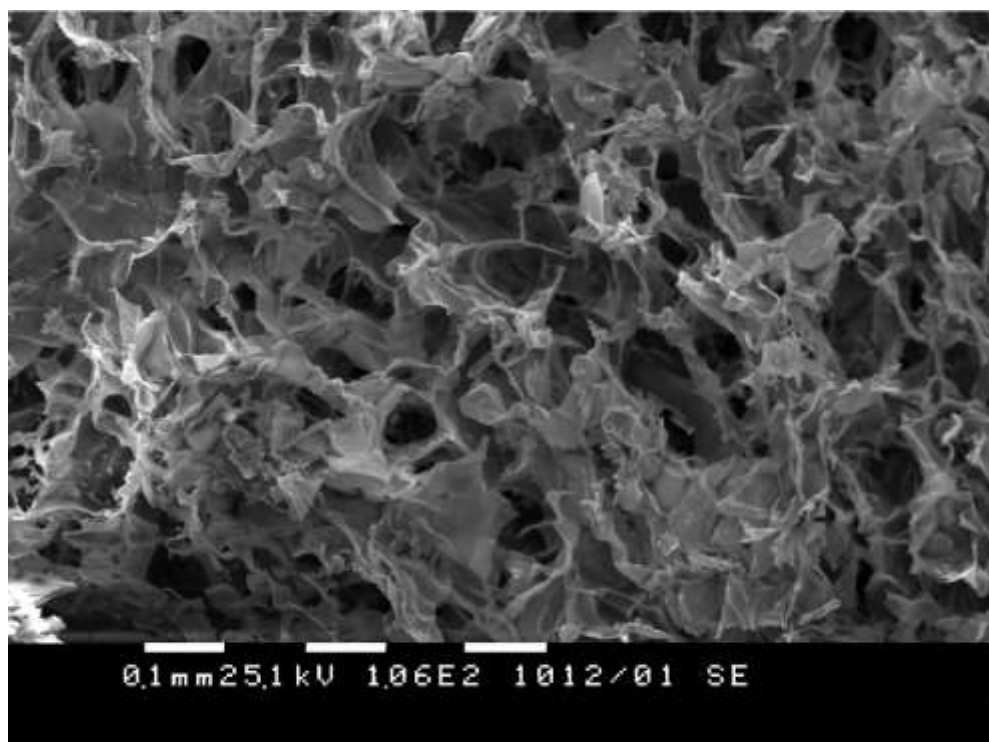
Оцветяването с DAPI се използва за изследване на апоптотичните промени в ядрото на туморните клетки MCF-7, третирани с полизахаридни проби. Контролата (нетретирани туморни клетки) е с интактни ядра, с гладък ръб и хомогенно разпределен хроматин (Фигура 37a1). Открити са клетки в различни фази на митоза (Фигура 37a1).

Промените в ядрената морфология на туморните клетки MCF-7, индуцирани от третирането с полизахарид, включват кондензация на хроматин (хетерогенно разпределен хроматин с гранулирана структура), фрагментиране на ядрото и образуване на апоптотичните тела (Фигура 37 b1-e1). Полизахаридите като естествени продукти с противоракова активност, които са широко присъстващи в микроводорасли, а също и в много растения, са тема на много проучвания, които са установили, че индуцират апоптоза на раковите клетки, като един от техните важни механизми [Gan et al., 2020]. Полизахаридите от водорасли като широко използвани за различни биомедицински приложения, са важни и трябва да се има предвид фармацевтичният потенциал, биоразградимост и биосъвместимост [Bai and Tuvikene, 2021].

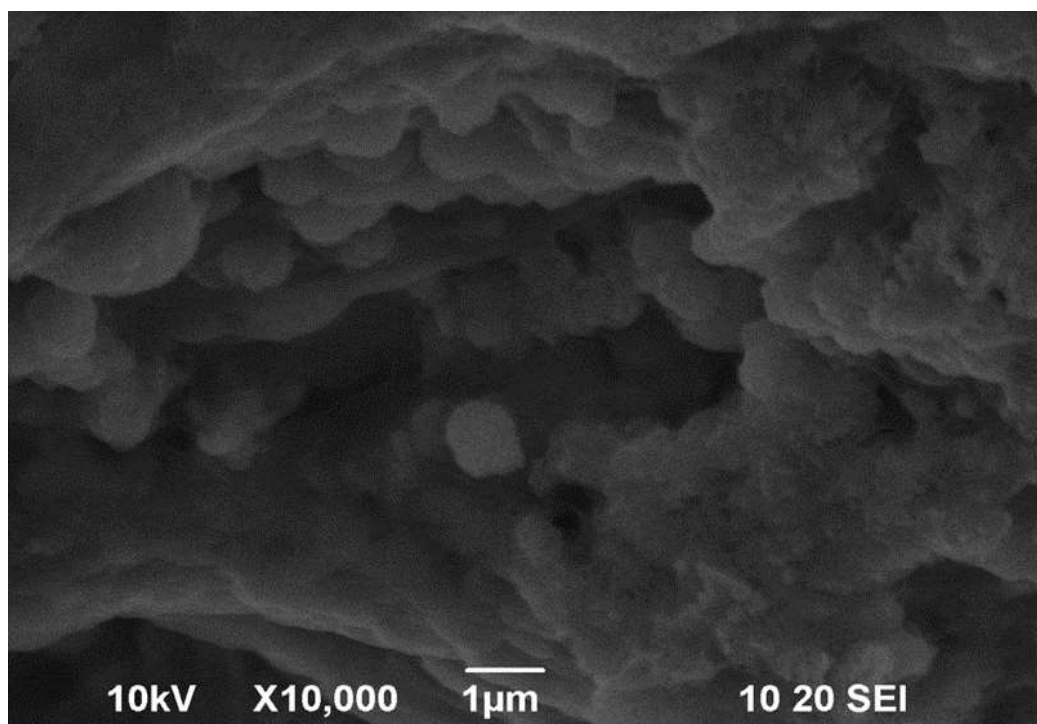
По-нататъшни изследвания биха могли да изяснят връзката между структурата на полизахаридите и тяхната биоактивност. Тежестта на проблема с рака, който се превърна в значителен проблем за общественото здраве, предизвика допълнително внимание и изследвания за ефективни и безопасни методи за лечение на рак. Потенциалните ползи за здравето от сулфатираните полизахариди, получени от морски водорасли, идват от тяхното потенциално приложение за разработване на лекарства за лечение на ракови клетки със специфичен ефект върху раковите и по-нисък неблагоприятен ефект върху нормалните клетки.

11. Изследване на имобилизираните препарати със сканираща електронна микроскопия (SEM)

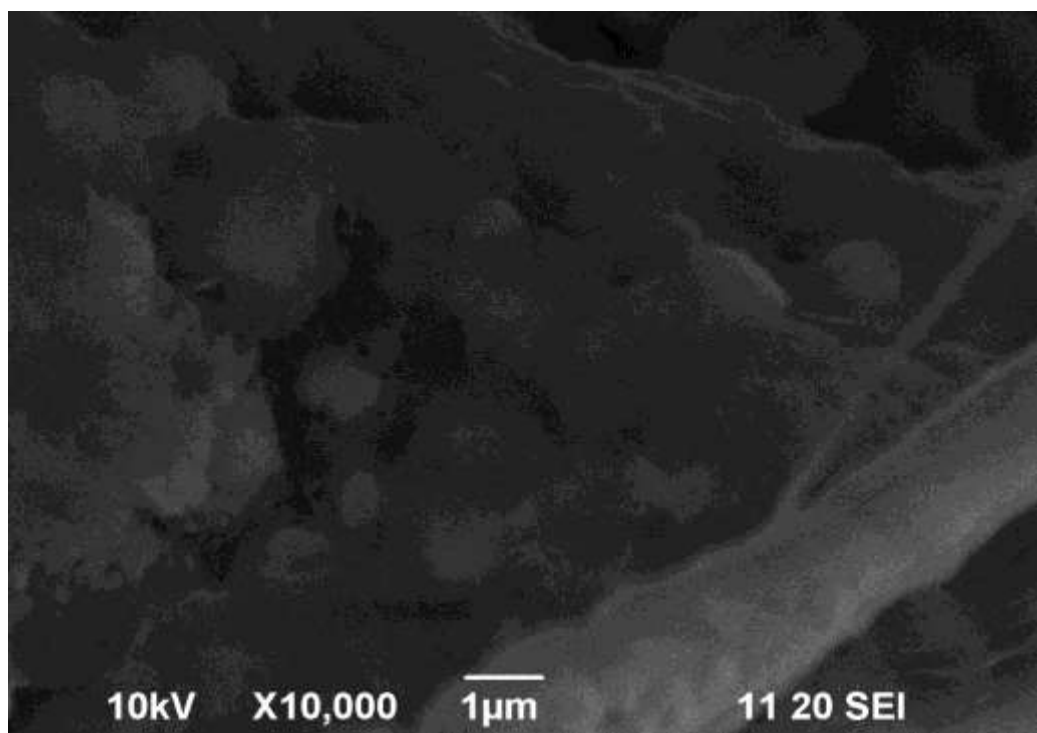
От SEM микрографиите на изследваните проби се вижда , че полученият криогел има хетерогенна супер-макропореста структура (Фигура 38). Бактериалните клетки са хомогенно разпределени и прилепнали към всички повърхностни пространства на носителя, образувайки биофилм. Равномерното разпределение е важен критерий за правилната адсорбция и запазена активност по цялата повърхност на имобилизираните клетъчни колонии. Колониите, образувани от клетките на щама, се визуализират добре от SEM микрографиите (Фигура 39). Освен това проучванията със сканираща електронна микроскопия потвърждават, че клетките запазват формата си и равномерното си разпределение след много цикли на употреба.



Фигура 38. НЕС криогелна матрица без клетки



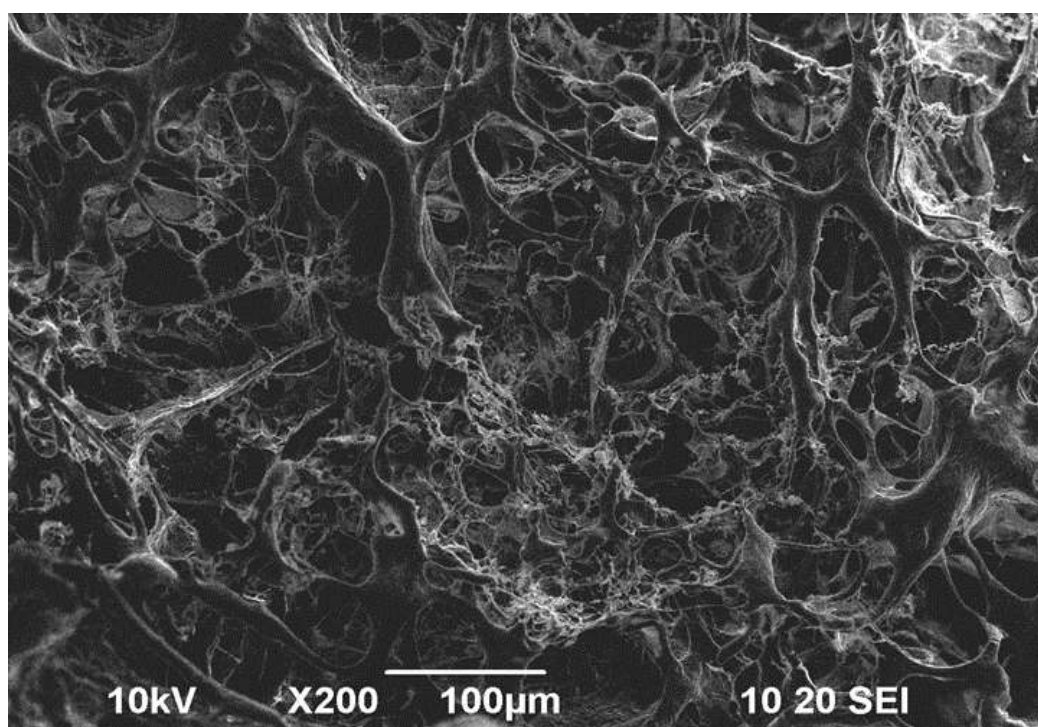
Фигура 39. НЕС криогелна матрица с клетки на *Porphyridium cruentum* в обема на матрицата



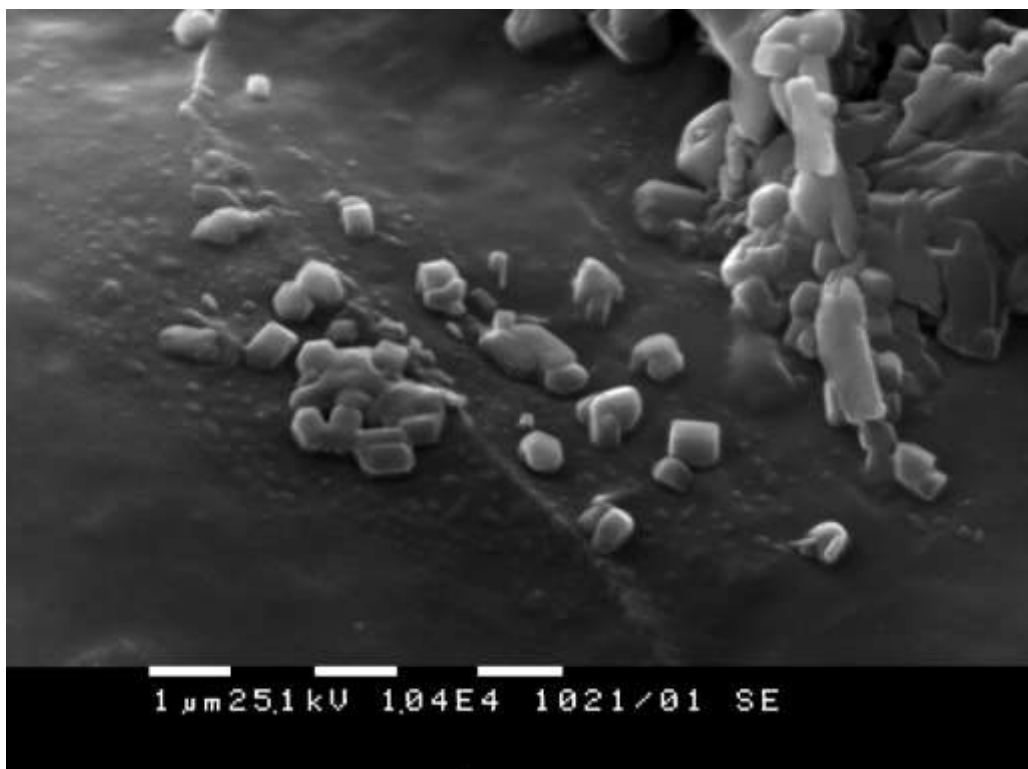
Фигура 40. НЕС криогелна матрица с клетки на *Rhodella reticulata* в обема на матрицата

Трябва да отбележим, че размерът на порите на криогелове, който е в диапазон от 100 μm до 400 μm , и фактът, че процесът на лиофилизация запазва отворената порьозна структура на криогелове (Фигура 38, 41), позволяват лесно имобилизиране на клетките в криогелния матрикс.

Поради това, клетките на водораслите бяха затворени и в геловте чрез накисване на лиофилизирани дискове в клетъчна суспензия докато 95% от суспензията е навлязла в матрицата (Фигура 39, 40). Забележително е, че в случая с криогел, синтезиран от НЕС, изтичането на клетки беше незначително.



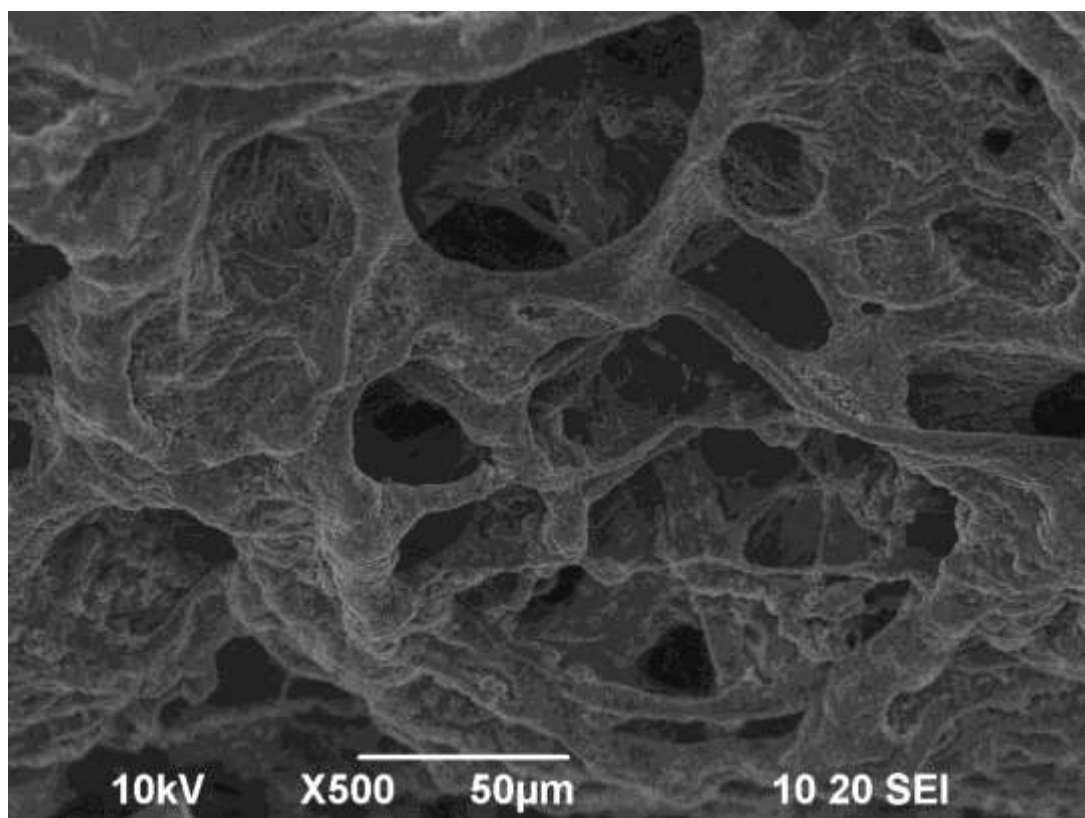
Фигура 41. SEM на РЕО криогел, без включени клетки



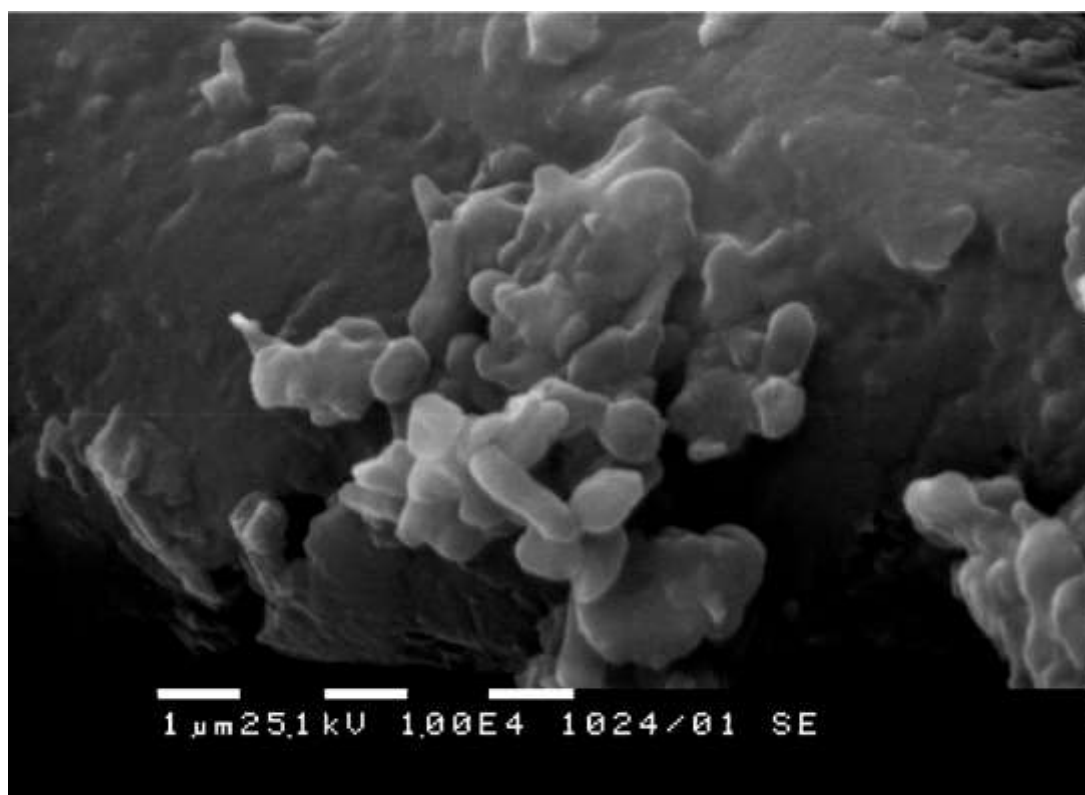
Фигура 42. Имобилизирани в РЕО клетки на *Pseudomonas aeruginosa*

След размразяване криогелите, те се състоят от гладки полимерни стени, получени от микрофазата, които са заобиколени от взаимно свързани пори, пълни главно със свободна вода от разтопените ледени кристали, което вероятно е причината за запазване активността на включените клетки (Фигура 42, Фигура 44).

Визуализират се множество запазени, равномерно разпределени клетки на *Pseudomonas aeruginosa*, включени в РЕО криогела (Фигура 42), които според получените резултати се вижда, че са запазили анаболитните си функции.



Фигура 43. SEM на PAAm криогел без включени клетки



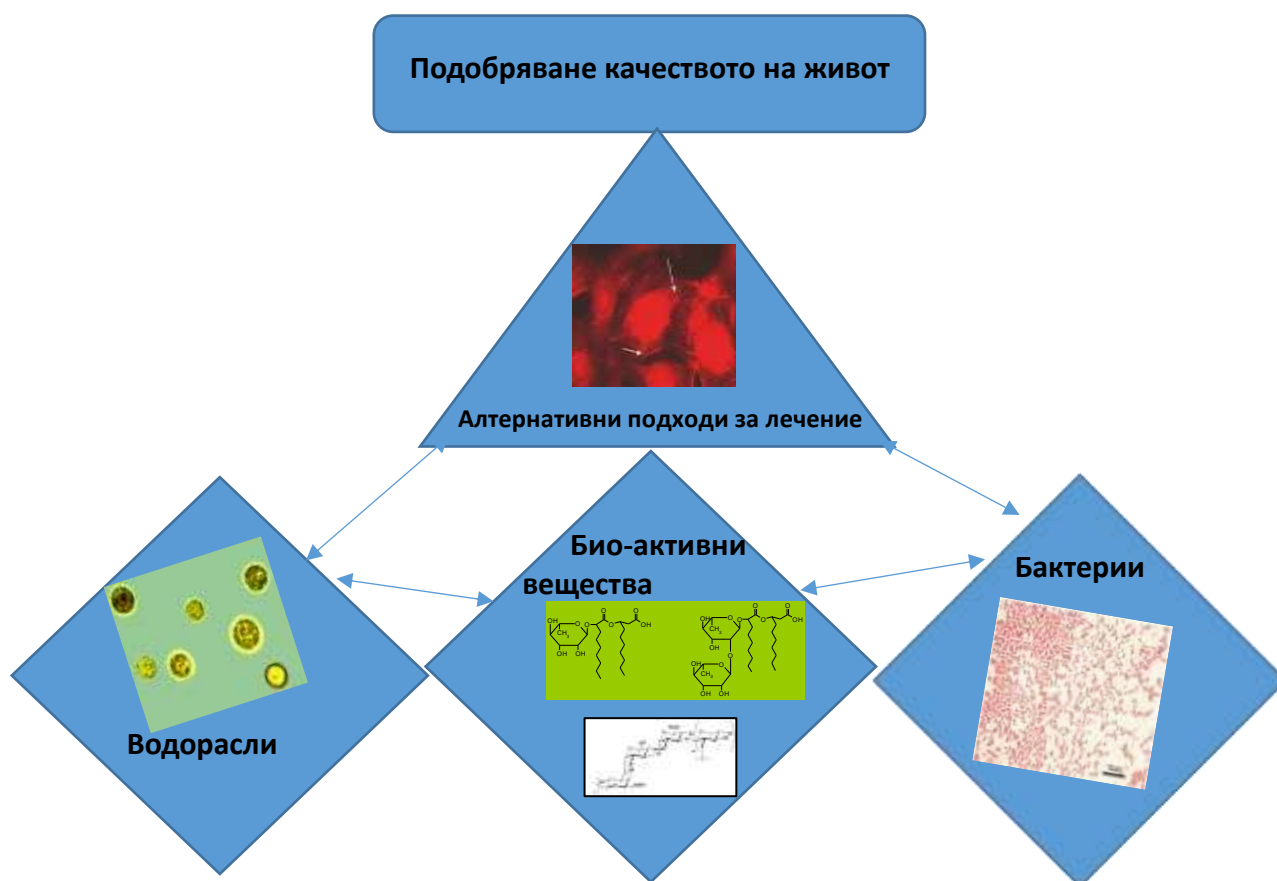
Фигура 44. *Rhodococcus wratislavenensis* имобилизирана в PAAm криогел

Визуализират се по-големи кухни с по-малък брой взаимосвързани канали при РААм криогела (Фигура 43).

Имобилизацията не само опростява отделянето и възстановяването на използваните клетки, но също така прави приложението им многократно, което намалява общите разходи [Cunningham et al., 2004]. Wilsey и Bradely [Wilsey и Bradely, 1996], използват свободни и имобилизирани клетки на *Pseudomonas sp.*, като изследването показва, че имобилизацията води до комбинация от засилен контакт между клетката и въглеводородните капчици и повишено ниво на рамнолипидно производство.

В настоящия труд са проучени възможностите за интензифициране на процеса на биосинтез чрез имобилизиране на микробните клетки. Трябва да се подчертае, че високият анаболитен потенциал на имобилизирани клетки на изследваните бактериални и водораслови щамове в сравнение със свободните такива е изключително устойчив във времето, в което е и смисъла на имобилизацията. Не за подценяване е изборът на правилен носител, какъвто е използвания в случая криогел, при който поровите канали на криогелове се изпълват главно със свободна вода. Именно това е причината в тях да се запазва жизнеността на клетките, както и метаболитните им способности.

Изборът на носител е важен въпрос и зависи от целта, за която ще се използва материала. Броят на клетките, прикрепени към носителя зависи от вида му. В нашите експерименти, ключов момент беше липсата на изтичане на клетки. Изглежда, че криогелните матрици, имат вътрешна структура, която държи клетките вътре в носителя. Стените на криогела са частично затворени и с взаимосвързани пори, съдържащи клетките. Именно по този начин те предотвратяват изтичането на клетки. В крайна сметка беше демонстрирано, че имобилизираните клетки могат да бъдат по-ефективни, да действат по-добре и по-бързо и за по-дълъг период от време, като по този начин могат да участват в процеси за биопродукция на ценни биологичноактивни вещества с потенциално приложение в биомедицината, а от там и подобряване качеството на живот на хората (Фигура 45).



Фигура 45. Получаване на биологични агенти от бактерии и водорасли с потенциално приложение в биомедицината

Важен принос на настоящия дисертационен труд е и изолирането на няколко биологични агенти от бактерии и водорасли с потенциално приложение в биомедицината.

IV. ИЗВОДИ

1. Осъществен е подбор на бактериални продуценти на гликолипидни биосърфактанти - *Pseudomonas aeruginosa* и *Rhodococcus wratislavensis*.
2. Бързото спадане на повърхностното напрежение и при двата микробни щама беше придружено от формирането на стабилни емулсии на безклетъчната култура в бульон с керосин, което показва производството на биосърфактант.
3. Използването на метода на имобилизация и подбора на подходяща матрица – полиетиленоксидна криогелна матрицата при избрания бактериален щам *Pseudomonas aeruginosa* се оказа подходяща, като използването и доведе до увеличен синтез на рамнолипиди.
4. Доказано е намаление в преживяемостта на изпитаните две ракови клетъчни линии, след прилагане на различни концентрации от синтезирания бактериален продукт, най-силно изразено върху високометастатичната клетъчна линия - MDA-MB 231, с незначимо намаление на действието върху нормалната клетъчна линия - MCF-10A. Представените данни сочат, че моно-рамнолипидите са по-ефективни от ди-рамнолипидите.
5. От щам *Rhodococcus wratislavensis* бяха изолирани трехалозолипидни биосърфактанти.
6. Най-подходяща за имобилизация на *Rhodococcus wratislavensis* се оказа криогелната матрица, синтезирана на основата на полиакриламид, което доведе до увеличена продукция.
7. Най-високият ефект от третирането с получения трехалозолипид е открит за нискометастатичната клетъчна линия MCF-7, последван от високометастатичната MDA-MB-231 и слаб ефект върху нормалната клетъчна линия MCF-10A.
8. Подбрани са водораслови продуценти на екзохетерополизахариди – червени микроводорасли – *Porphyridium cruentum* и *Rhodella reticulata*.

9. След осъществяване на имобилизация в НЕС криогелна матрица беше посигнато увеличение в продукцията на полизахариди и от двата изпитвани щама.
10. Регистрирано е намаление на жизнеността на раковите клетъчни линии в зависимост от концентрацията на хетерополизахарида и от двете червени микроводорасли, като по-силен е ефектът при високо метастатичната клетъчната клетъчна линия на рак на гърдата MCF-7 и почти никакъв инхибиторен ефект върху нормалната клетъчна линия.
11. Предварителната обработка с микровълни на повърхностната фракция на екзополisahарида от *Porphyridium cruentum* води до повишено съдържание на суфати в изпитвания полизахарид, като се регистрира намаленаа жизнеспособност на туморните клетки.
12. Установеният силен ефект от третирането с трехалозолипидния биосърфактант на нискометастатичната клетъчна линия MCF7, а при третиране с рамнолипиди върху високометастатичната клетъчна линия MDA-MB231, показва съществуването на зависимост между естеството на раковите клетъчни линии и нормалните клетки според химичния състав, време на експозиция, концентрацията, чистота и нивото на намаляване на повърхностното напрежение от приложените гликолипиди и тяхната ефективност.
13. Полизахаридът от *Porphyridium cruentum* показва значителен и зависим от дозата антипролиферативен и цитотоксичен ефект, като са доказани промени в ядрената морфология на туморните клетки MCF-7, включително кондензация на хроматин, фрагментация на ядрото и образуване на апоптотични тела.

V. ПРИНОСИ

- Доказано е, че при добър подбор на матрица за имобилизация, имобилизираните препарати са подходящи за многократно използване и увеличение в продукцията на търсения продукт.
- Използването на криогелни РЕО, РААм и НЕС матрици при осъществената имобилизация на бактериални и водораслови клетки от подбраните продуценти се оказва ефективен подход, който разчита на нетоксичността, достъпността, бързината и лесната манипулация с тях, като универсален инструмент за повишаване на добива на гликолипидни биосърфактанти и водораслови хетерополизахариди.
- Най-високият ефект от третирането с получения трехалозолипид е открит за нискометастатичната клетъчна линия MCF-7, последван от високометастатичната MDA-MB-231, докато третирането с рамнолипидите показва по-силен ефект върху високометастатичната линия.
- При третиране на ниско и високометастатичните ракови клетъчни линии с изолирания водораслов хетерополизахарид от *Rhodella reticulata* при високо метастатичната клетъчната клетъчна MDA-MB231, беше постигнато намаление в жизнеността на клетките - 44%.
- Изпитваните полизахаридни проби от червеното микроводорасло *Porphyridium cruentum*, значително намаляват жизнеспособността и пролиферацията на клетките от карцином на дебелото черво HT-29 - с най-ниски стойности на клетъчна жизнеспособност, достигащи до 46%, на клетки от карцином на шийката на матката HeLa при всички тествани концентрации, намалява жизнеспособността на туморните клетки MCF-7 до стойности, вариращи до 25%.
- Резултатите за MCF-10A нормални клетки показват леко влияние върху клетъчната им жизнеспособност и за двата прилагани рамнолипиди и трехалозолипида и най - вече това важи за изолираните хетерополизахариди в сравнение с демонстрирания ефект върху раковите клетъчни линии. По-малката цитотоксичност към неракови клетки е най - добрият сценарий за противоракови приложения.

- Полизахаридите имат много очевидни фармакологични ефекти при лечението на туморни клетки - без странични ефекти и следователно са една от алтернативите за лечение на ракови заболявания вместо традиционните химиотерапии. Използването на естествени бактериални и водораслови продукти е полезно средство поради техните малко или никакви странични ефекти.

VI. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ПРОЕКТ

1. J. Ivanova, B. Nikolova, **A. Konstantinidou**, L. Kabaivanova, Polysaccharides produced by two red algal strains grown in digestate with potential ability of tumor cell inhibition. *Oxidation Communications* 44, No 4, 780–789 (2021) – Q3
2. Juliana Ivanova, **Angeliki Konstantinidou**, Lyudmila Kabaivanova, Ani Georgieva, Ivelin Vladov, Svetlozara Petkova, Examination of exopolysaccharides from *Porphyridium cruentum* for estimation of their potential antitumor activity in vitro. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences* (“Доклади на БАН”) – под печат – Q2