

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ
БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ОРГАНИЧНА ХИМИЯ С ЦЕНТЪР ПО ФИТОХИМИЯ

ОБЩОИНСТИТУТСКИ СЕМИНАР:

Представяне на най-добрите работи за 2017 г., излъчени от колоквиумите на Института по органична химия с Център по фитохимия, БАН

НАУЧНО-ПРИЛОЖНА РАЗРАБОТКА ОТ КОЛОКВИУМА „ХИМИЯ НА ПРИРОДНИТЕ
ВЕЩЕСТВА“

ТЕМА: КИСЕЛИ ХЕТЕРОПОЛИЗАХАРИДИ С ИМУНОМОДУЛИРАЩ И ПРОТИВОВЪЗПАЛИТЕЛЕН
ЕФЕКТ ОТ БЪЛГАРСКИ БИЛКИ

НАУЧЕН КОЛЕКТИВ: ЙОРДАН ГЕОРГИЕВ, МАРИЯ КРАЧАНОВА, МАНОЛ ОГНЯНОВ, ПЕТКО ДЕНЕВ

ЛАБОРАТОРИЯ: „БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ВЕЩЕСТВА – ПЛОВДИВ“



БЪЛГАРСКА
АКАДЕМИЯ
на НАУКИТЕ
1869

23 ЯНУАРИ 2018 Г.

ГР. СОФИЯ



ИНСТИТУТ
ПО ОРГАНИЧНА ХИМИЯ
С ЦЕНТЪР ПО ФИТОХИМИЯ
Българска Академия на науките

Същност на научно-приложната разработка

Научен аспект:

1. Получена е за първи път в Европа обемна справочна информация за съдържанието на водно-екстрахируеми полизахариди в 34 широко използвани лечебни растения и горски плодове (**29 от тях са със стопанско значение**), като е оценена и тяхната *in vitro* и *ex vivo* имуномодулираща активност.
2. В рамките на изследването, за първи път, е охарактеризиран полизахаридният състав в 11 европейски и в частност български лечебни растения, като е определена частично първичната структура на някои от изолираните полизахариди.
3. На базата на изследванията е открито, че пектините в цветовете на липата, лавандулата и листата на копривата допринасят за техните имуномодулиращи и противовъзпалителни ефекти.

Приложен аспект:

- ✓ Установено е, че продължителната екстракция с гореща вода е надежден начин за получаване на богати на пектинови полизахариди комплекси с висока имуномодулираща активност.
- ✓ Получените по този начин пектини могат да служат за разработването на нови функционални храни и напитки с приложение във фитотерапията, рационалното и диетичното хранене на човека.

1. Подбор на имунологично активни водно-екстрахируеми полизахарид-съдържащи комплекси (ПЗСК-и) от традиционни и перспективни за България лечебни растения

Не се откриват данни за ПЗ-ния състав на лавандула, мурсалски чай, сапуниче, върбинка, цариче, лофант, бял риган, котешка стъпка и листата на къпина, ягода и коприва! – за 11 от 34-те билки няма данни за ПЗ-те.

Получаване на водно-екстрахируеми ПЗСК-и: двукратна екстракция с кипяща вода до намаляване на обема на сместа наполовина – 42 бр. ПЗСК-а.

В 29 от 42-те проби съдържанието на общи захари е над 50% (медиана=56.1%), което показва, че ПЗ-те не са съпътстващи съединения в комплексите.

Застъпени монозахариди в пробите (низходящ ред): GalA, Ara, Gal, Glc, Rha, Man, Xyl и Fuc.

От данните за въглехидратния състав се вижда, че изследваните билкови ПЗСК-и съдържат значителни количества кисели и неутрални хетеро(/хомо)полизахариди, като пектини, глюкани (вкл. нишесте), хетероманани, инулини и др.

Ex vivo интестинална имуномодулираща активност (100 µg/mL)

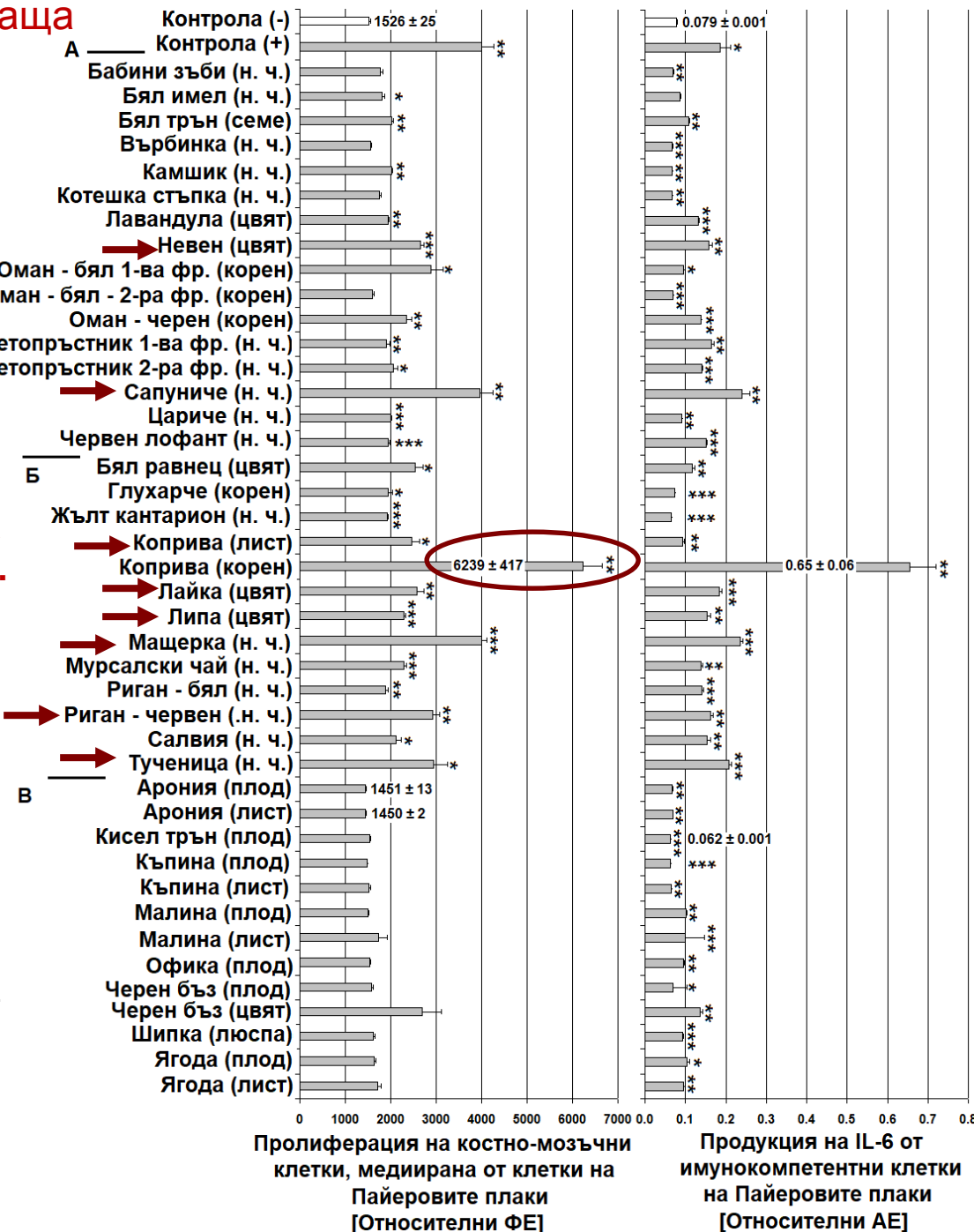
Опитни мишки със силно намален отговор към липополизахариди (ЛПЗ) (СЗН/HeJ, Tlr4^{Lps-d})

Най-активен комплекс: Коприва (корен)



Пайерова плака от тънките черва на опитна мишка.

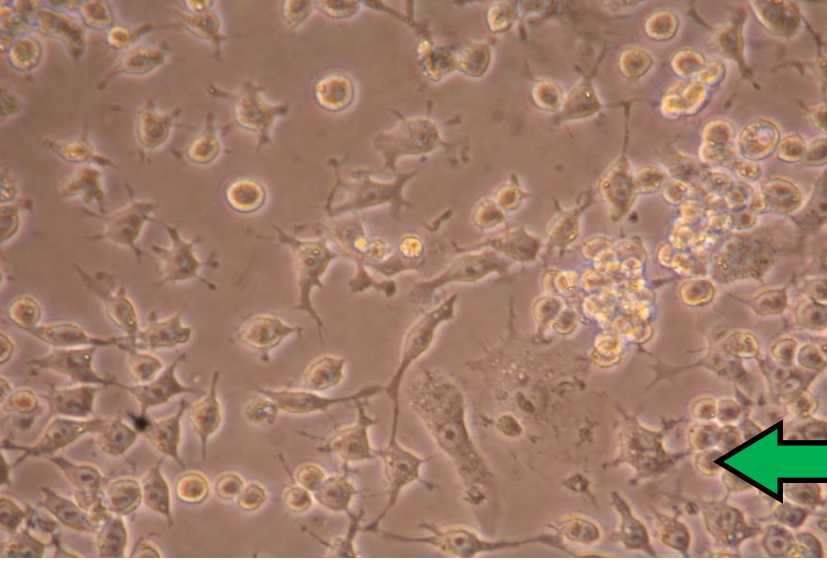
Фиг. 1 Повишение в продукцията на костно-мозъчни пролиферативни цитокини от клетки на Пайеровите плаки (ПП), култивирани с или без ПЗСК-и (100 µg/mL) (вляво). Повишение в продукцията на IL-6 от клетки на ПП, култивирани с или без ПЗСК-и (вдясно). Звездичките показват статистическата значимост (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001) срещу (-) контрола (H₂O). (+) контрола: пектинова фракция AMOL-1, съдържаща АГ-II. Ф(А)Е (флуоресцентни (абсорбционни) единици).



Уникален полизахарид от липов цвят

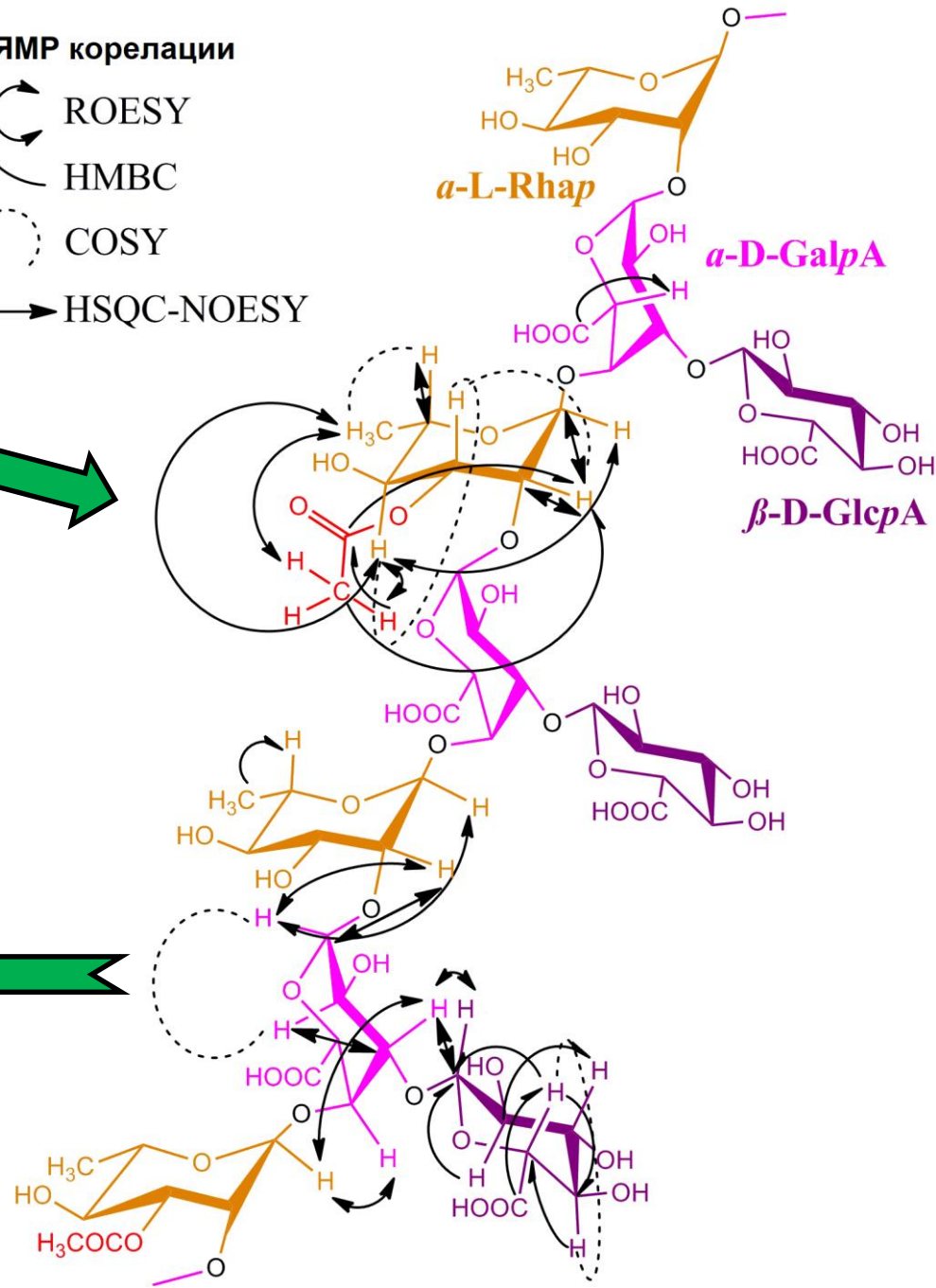


(Tilia tomentosa)



Активирани на имунни клетки

- ЯМР корелации**
- ↻ ROESY
 - ↷ HMBC
 - ⊙ COSY
 - ↔ HSQC-NOESY



Ацетилян глюкуроно-рамногалактуронан I (PSIII)

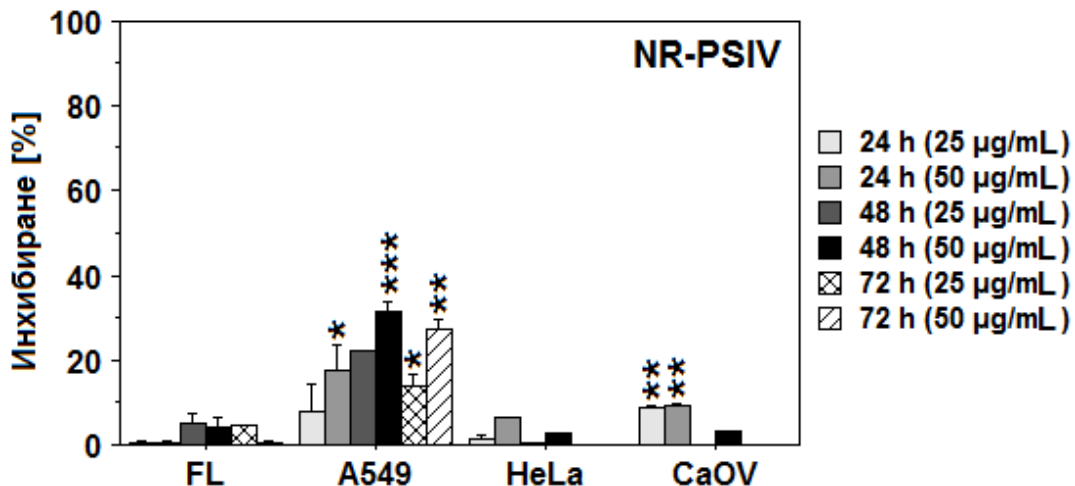
Фиг. 3 Химична структура на PSIII, определена чрез GC-MS метилизационен анализ за типа на гликозидните връзки и 2D ЯМР анализ на монозахаридната последователност. Показани са най-важните H/H и C/H ЯМР корелации.

3. Имуномодулираща активност на пречистените билкови полизахариди:

- ❖ *in vitro* комплемент-фиксираща
- ❖ *ex vivo* интестинална имуномодулираща
- ❖ *ex vivo* активиране на неутрофили (продукция на реактивни форми на кислорода)
- ❖ *in vitro* активиране на макрофаги (продукция на азотен оксид)

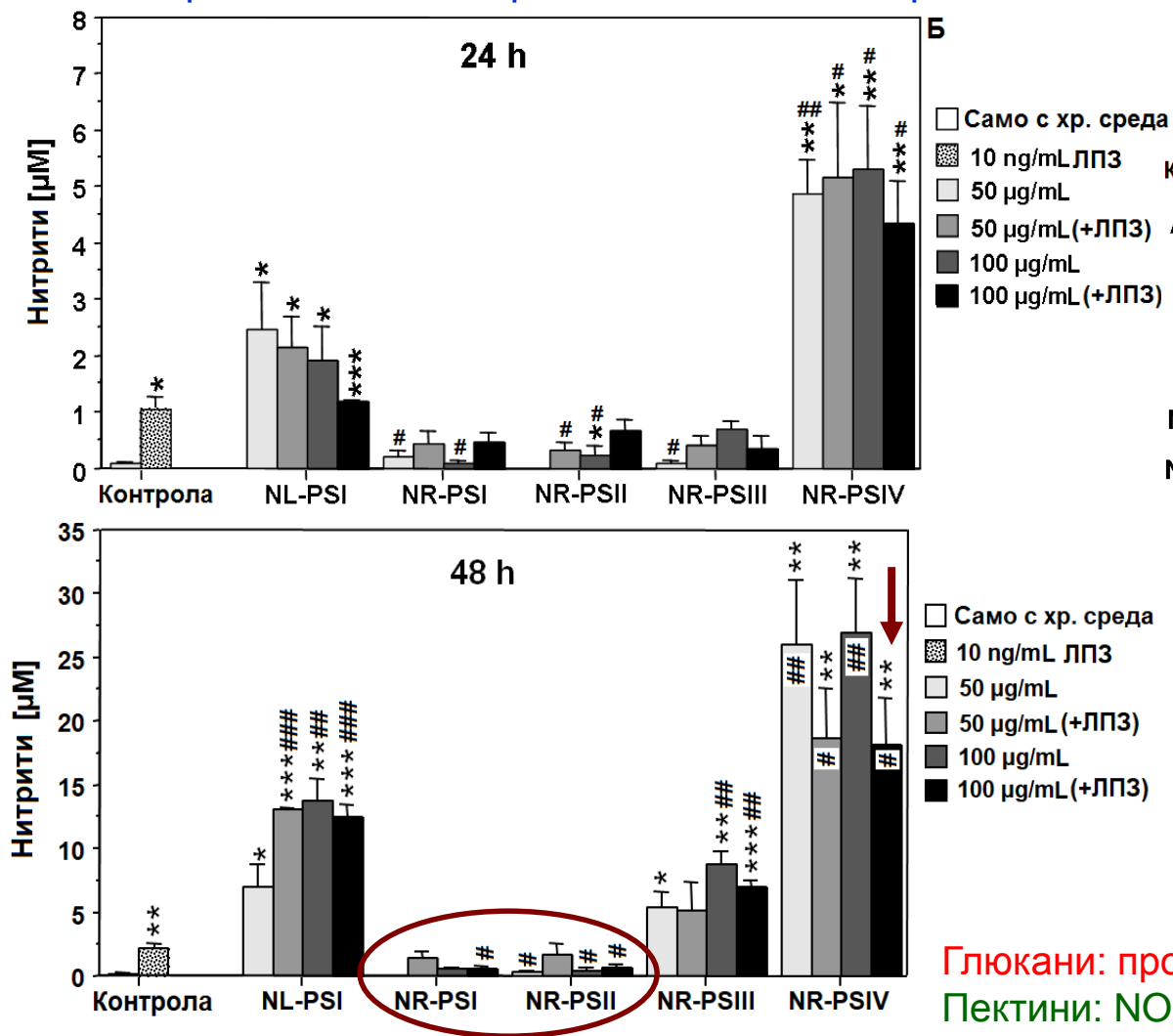
Извод: Изучените билкови пектини притежават потенциал за модулиране на вродения и придобития имунитет.

Други ефекти: *in vitro* противоракова активност

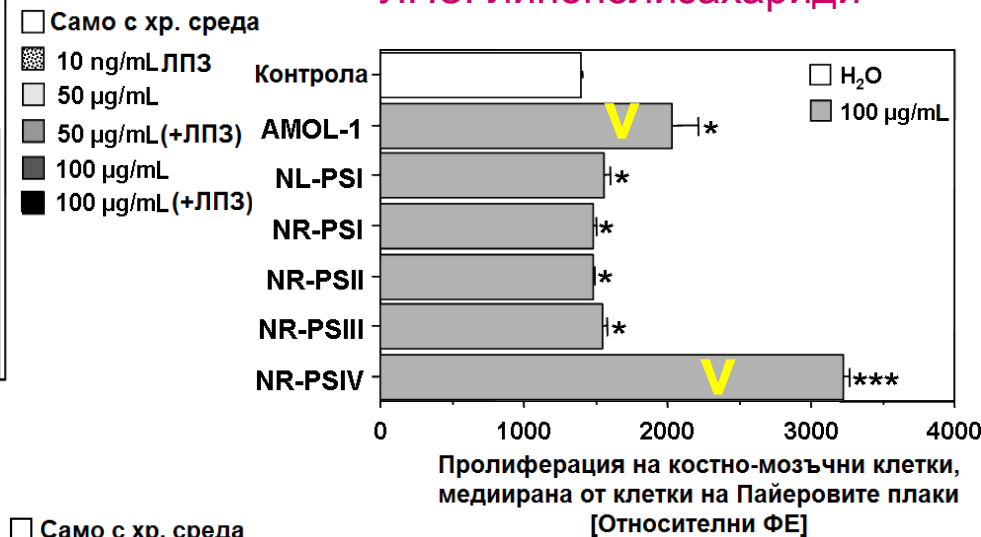


Фиг. 4 *In vitro* потискащ ефект на пектинова фракция NR-PSIV от корените на коприва върху **FL** (нормални амниотични клетки), **A549** (белодробен аденокарцином), **HeLa** (аденокарцином на яйчниците) и **CaOV** (цистаденокарцином на тестисите) клетки. Звездичките показват статистическата значимост (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) срещу контрола (**FL**).

Ефекти върху миши макрофаги и интестинална имуномодулираща активност на изолираните полизахариди от листата и корените на обикновената коприва (*Urtica dioica*)



ЛПЗ: липополизахариди



Фиг. 7 *Ex vivo* интестинална имуномодулираща активност. Символите показват статистическата значимост (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$) срещу (-) контрола (H_2O). **AMOL-1** е (+) контрола. **ФЕ** (флуоресцентни единици).

Глюкани: противовъзпалителен.

Пектини: NO-стимулиращ и противовъзпалителен.

Фиг. 6 *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.

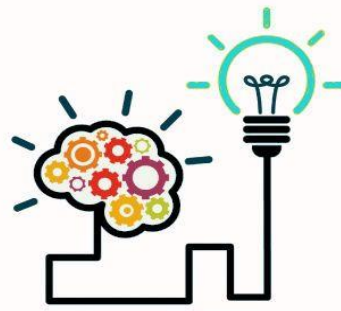
НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ



В ход е разработването на функционална напитка и хранителна добавка на основата на активните проби.

Фиг. 8 Лабораторна схема за приготвяне на смесен полизахарид-съдържащ екстракт с антиоксидантно и имуномодулиращо действие от избрани билки. Съкращения: **M:B** (изходен материал:вода).

Оригиналност на разработката



**IT IS BETTER TO FAIL
IN ORIGINALITY THAN
TO SUCCEED IN
IMITATION.**

HERMAN MELVILLE

QuotePixel.com

Научни приноси:

✓ Открито е, че полизахаридните комплекси от редица широко използвани български билки (мащерка, липа, лайка, бял равнец, черен бъз, невен, коприва и др.) повлияват интестиналната имунна система.

✓ 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 рамногалактуронан тип I (РГ-I).

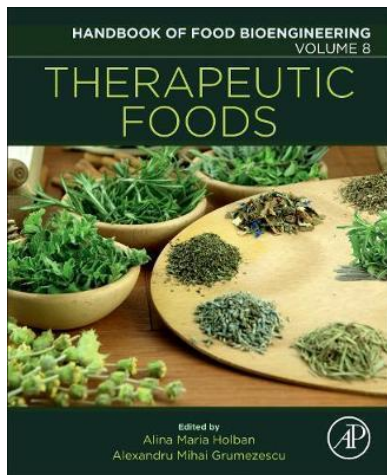
✓ Открито е, че в цветовете на обикновената лавандула се съдържат биологично активни, ацетилирани и високометоксилирани пектинови ПЗ, богати на хомогалактуронан, последван от РГ-I със странични вериги от арабиногалактан тип II. Лавандуловите пектини показват *ex vivo* имуностимулиращо действие върху фагоцитарни левкоцити и интестинална имуномодулираща активност.

✓ 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.

Оригиналност на разработката

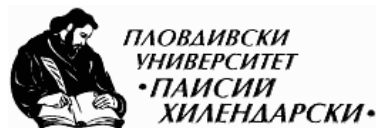
Публикации по разработката (**ОБЩ ИМПАКТ ФАКТОР: 13.293**):

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 β -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, 2018, Cambridge: Elsevier, ISBN: 9780128115176.



Цитируемост за годината на публикуване (от лятото на 2017): 5.

Научно и научно-приложно сътрудничество със:



北里大学
KITASATO UNIVERSITY



The Czech Academy
of Sciences



UiO
University of Oslo



Финансирането на настоящата работа беше подкрепено както следва:

1. Проект BG161PO003-1.1.05-0024-C0001 „Получаване на нутрацевтици с антиоксидантно и имуностимулиращо действие“. Финансиран по процедура „Разработване на иновации от стартиращи предприятия“ към ОП „Развитие на конкурентоспособността на българската икономика 2007-2013 г.“ Бенефициент: „ИТЦ – Иновативно-технологичен център“ ООД с управител проф. дхн Хр. Крачанов (2012-2014, приключил).

2. 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 (2014 г., приключил).

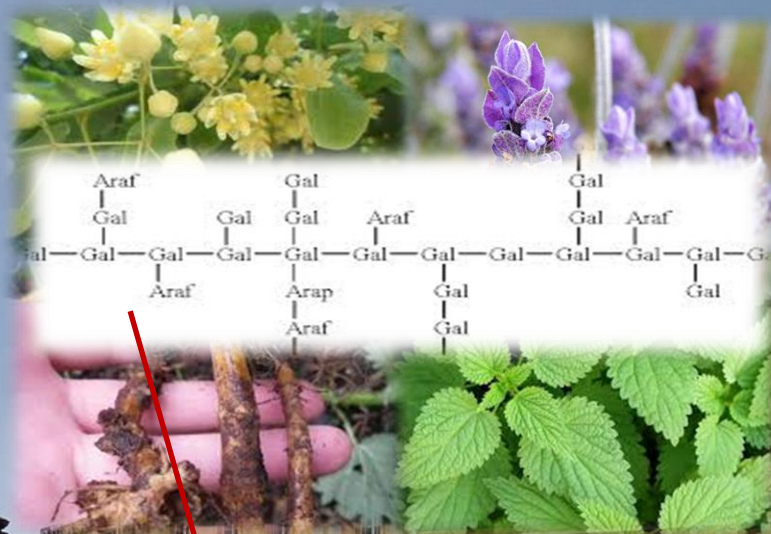
3. Секторна програма Еразъм+ през конкурс на БАН (2015-2016 г.).

4. Проект на Министерството на образованието, младежта и спорта на Чехия [№ LQ1605 NPU II; проект MSM0021622430].

5. 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 (2016 г., приключил).

УСПЕШНА И ЩАСТЛИВА 2018!

БЛАГОДАРЯ ЗА ВНИМАНИЕТО!



Ис... фона: Пламен Агов, Лемън Трий Студио