



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА
ЛАБОРАТОРИЯ „ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА АЛГОЛОГИЯ“

ТАНЯ СТАВРЕВА ТОШКОВА-ЙОТОВА

БИОЛОГИЧНА АКТИВНОСТ НА ПРОДУКТИ ОТ
***COELASTRELLA* SP. BGV**

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователната и научна степен „доктор“

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Научна специалност: Физиология на растенията
(шифър: 01.06.16)

Научен консултант:

доц. д-р Пламен Пиларски

София, 2020

Дисертационният труд е написан на 135 стр. и съдържа 29 фигури и 8 таблици. Списъкът на цитираната литература включва 315 заглавия, от които 7 на кирилица.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на разширен научен съвет на Лаборатория „Експериментална алгология“, към Институт по физиология на растенията и генетика - БАН, проведено на 17.09. 2020 г. (със заповед № 775/01.09.2020 г. на Директора на Института)

Експерименталната работа по представения дисертационен труд, е извършена основно в Лаборатория „Експериментална алгология“ на ИФРГ-БАН. Част от изследванията са проведени в Института по експериментална морфология, патология и антропология с музей (ИЕМПАМ) – БАН, ИОХЦФ-БАН.

Публичната защита на Дисертационния труд ще се състои на декември 2020 г. от часа в Заседателната зала на ИФРГ-БАН (ул. „Акад. Георги Бончев“, бл. 21, ет.2, гр. София).

Членове на научното жури:

Вътрешни членове

проф. д-р Валя Василева – ИФРГ, БАН

проф. д-р Лиляна Гилова – ИФРГ, БАН

Външни членове:

проф. дн. д-р Майя Стойнева – БФ, СУ

проф. дн. д-р Елена Николова – ИЕМПАМ, БАН

проф. д-р Румяна Цонева – ИБФБМИ, БАН

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в Библиотеката на Институт по физиология на растенията и генетика - БАН (ул. „Акад. Георги Бончев“, бл. 21, ет.2, стая 225, гр. София) и на Web страницата на Института, <http://www.bio21.bas.bg.ippg/>

БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам своята сърдечна благодарност на научния си консултант доц. д-р Пламен Пиларски, за професионализма, търпението, човешкото отношение, съветите и силната подкрепа, която ми оказа при разработване на настоящия дисертационен труд.

Изключително съм признателна и благодаря на проф. д-р Лиляна Гигова за оказаната помощ, подкрепа и ценни съвети.

Благодаря от сърце на гл. асистент д-р Иванина Василева и на всички колеги от Лаборатория „Експериментална алгология“, за това че споделиха ценния си професионален опит с мен, за положителните колегиални взаимоотношения и отзивчивост.

Специални благодарности изказвам към Ръководството на ИФРГ-БАН осигурили всички необходими условия за ползотворна изследователска дейност и подкрепа.

Искрена благодарност и признателност поднасям на гл. асистент д-р Ани Георгиева и проф. д-р Ренета Тошкова от ИЕМПАМ-БАН за предоставените клетъчни линии и съвместна работа при провеждане на опитите за антитуморна активност, на доц. д-р Ганка Чанева от БФ на СУ“Кл. Охридски“ за предоставените щамове и съвместна работа при изследване на антимикробната активност, на проф. д-р Петко Денев и екипът му, от ИОХЦФ-БАН и на инженер д-р Пенчо Тулешков от ИП-БАН за съдействието при провеждане на газ-хроматографски и HPLC анализи.

Благодаря на членовете на Научното жури за отделеното време и ценните препоръки.

Безкрайно благодаря на родителите ми, на съпруга и децата ми, на близките ми, за безграничната обич, търпение и подкрепа, които винаги са ми давали.

СЪДЪРЖАНИЕ:

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ.....	2
I. УВОД.....	3
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	3
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	4
III.1. Водораслов материал.....	4
III.2. Култивиране на микроводорасли, измервания и анализи.....	4
III.3. Газ- хроматографски – масспектрален анализ на липиден екстракт.....	5
III.4. Химична характеристика и състав на извънклетъчен полизахарид/и	5
III.5. Приготвяне на проби от <i>Coelastrella</i> sp. BGV за изпитване на биологична активност	6
III.6. Изследване на биологичната активност на метаболити и екстракти от <i>Coelastrella</i> sp. BGV.....	7
III.6.1. Изследване на анти туморна активност.....	7
III.6.1.1. МТТ тест.....	7
III.6.1.2. Цитоморфологични изследвания чрез прилагане на флуоресцентни методи.....	8
III.6.1.2.1. Оцветяване с акридин оранж (АО) и етидиев бромид (EtBr).....	8
III.6.1.2.2. Оцветяване с DAPI.....	8
III.6.2. Изследване на антибактериална и антигъбна активности.....	8
III.6.2.1. Агар-дифузионен метод.....	8
III.6.2.2. Диск-дифузионен метод.....	9
III.6.3. Антиоксидантна активност на алкохолен екстракт.....	10
III.7. Статистически анализ	10
IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	10
IV.1. Култивиране на зелени микроводорасли от род <i>Coelastrella</i> , измервания и анализи.....	10
IV.2. Характеризиране на маслен екстракт, мастни киселини и екзополисахариди от <i>Coelastrella</i> sp. BGV.....	15
IV.3. Биологична активност на продукти, получени от <i>Coelastrella</i> sp. BGV.....	22
IV.3.1. Анти туморна активност.....	22
IV.3.1.1. Антипролиферативен ефект на водораслови продукти – МТТ тест.....	22
IV.3.1.2. Цитоморфологични изследвания на HeLa туморни клетки, култивирани в присъствие на водораслови продукти, получени от <i>Coelastrella</i> sp. BGV, чрез флуоресцентни методи.....	29
IV.3.1.2.1. Оцветяване с акридин оранж (АО) и етидиев бромид (EtBr).....	29
IV.3.1.2.2. Оценка на ядрената морфология на HeLa туморни клетки, третирани с водораслови продукти от <i>Coelastrella</i> sp. BGV - Оцветяване с DAPI.....	32
IV.3.2. Антибактериална и антигъбна активности на водораслови продукти получени от зелено микроводорасло <i>Coelastrella</i> sp. BGV.....	35
IV.3.3. Антиоксидантна активност на алкохолен екстракт.....	41
V. ИЗВОДИ.....	42
VI. ПРИНОСИ.....	43
VII. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА.....	44
VIII. ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА	45

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

BALB/c 3T3	Нормална клетъчна линия - миши фибробласти
CV	Клетъчна жизнестойност (cell viability)
DAPI	4',6-диамино-2-фенилиндолин (флуоресцентното багрило)
DMEM	Среда за клетъчно култивиране (Dulbecco Modified Eagle's Medium)
DMSO	Диметил сулфоксид
Dox	Доксорубин
EtBr	Етидиев бромид
FBS	Фетален телешки серум
GC-MS	Газ-хроматография мас-спектрометрия
HeLa	Човешка ракова клетъчна линия от карцином на цервикса
MUFA	Мононенаситени мастни киселини
OD	Оптична плътност
PBS	Фосфатен буфериран физиологичен разтвор
PUFA	Полиненаситени мастни киселини
SDA	Агар (Sabouraud's Dextrose Agar)
SFA	Наситени мастни киселини
AE	Алкохолен екстракт
AO	Акридин оранж
ACB	Абсолютно сухо вещество
BT	Високотемпературен воден екстракт
ЕПЗХ	Екзополisahарид
ИЧ-ФТ	Инфрачервена спектроскопия с Фурие трансформация
КС	Културална среда
МЕ	Маслен екстракт
МИК	Минимална инхибираща концентрация
МК	Мастни киселини
НВ	Неосапуняеми вещества
НТ	Нискотемпературен воден екстракт
ТАА	Тотална антиоксидантна активност

I. УВОД

През последните десетилетия не стихва интересът към микроводораслите като перспективен и неизчерпаем източник на редица полезни продукти с приложения в хранителната, фармацевтичната, козметичната и текстилна промишленост, в екологията, селското стопанство, за производство на биогорива и др.

Нарастването на броя на онкологичните заболявания и смъртността сред хората, недостатъчно ефективната антитуморна терапия, както и появата на резистентни бактериални щамове към масово използваните антибиотици, пораждаат необходимост от търсене и изследване на нови природни продукти с антитуморно и антибактериално действие, съчетаващи висока специфичност, широк спектър на действие и безвредност за организма. Източници на такива продукти са микроводораслите, които имат разнообразен биосинтетичен и биотехнологичен потенциал и предоставят възможност за контролирано отглеждане и насочено производство на желани за практиката метаболити. Сред тях, с утвърдено практическо приложение са зелените микроводорасли (отдел Chlorophyta) *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina*, *Scenedesmus obliquus* и цианопрокариотното микроводорасло *Arthrospira (Spirulina) platensis* (отдел Cyanophyta). Те са продуценти на ценна биомаса и биологично активни вещества – пигменти, полизахариди, стероли, мастни киселини, витамини и други с биомедицинско значение. Особен интерес представляват каротеноидите - астаксантин, β -каротен, лутеин, зеаксантин, ликопен. Каротеноидите имат различни полезни за здравето свойства като антиоксидантна, антитуморна, антидиабетна, невропротективна активност и активност срещу затлъстяване, противовъзпалително, кардиопротективно и остео-защитно действие, обуславящи широкото им приложение за превенция и лечение на невродегенеративни и сърдечно-съдови заболявания, рак, диабет, катаракта и др. Използват се и при производството на хранителни добавки, козметични и фармацевтични продукти. *Haematococcus pluvialis* е един от най-добрите източници на природен астаксантин, а *Muriellopsis* sp. на лутеин. *Dunaliella salina* се използва за масово производство на β -каротен. Полизахаридите от цианопрокариоти, зелени и червени микроводорасли проявяват имуностимулиращо действие, притежават мощни антикоагулантни, противовъзпалителни, антитуморни, антивирусни и антиоксидантни свойства. Редица изследвания показват големият потенциал на вътреклетъчни и извънклетъчни продукти от микроводорасли и в борбата с патогени като бактерии, вируси, гъби и протозои.

Въпреки нарастващите постижения в областта на експерименталната и приложна алгология, само част от огромното богатство от микроводораслови видове е изследвана, а потенциалът на този полезен биоресурс остава неопознат и неизползван.

Настоящият дисертационен труд е насочен към разкриване на възможностите на български щам зелено микроводорасло да произвежда вещества с антибактериално, антигъбно и цитотоксично действие и към оценка на неговия потенциал за приложение в практиката.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата работа е да се изследва биологичната активност на продукти от подбран щам зелено микроводорасло *Coelastrella* sp.

За постигане на целта си поставихме следните задачи:

1. Сравняване на растежните характеристики и биохимичния състав на щамове от род *Coelastrella* и подбор на експериментален обект.

2. Получаване на продукти от подбрения щам *Coelastrella* sp. – нискотемпературен и високотемпературен водни екстракти, културална среда, алкохолен екстракт, маслен екстракт, мастни киселини, неосапуяеми вещества и екзополизахарид.

3. Характеризиране на маслен екстракт, мастни киселини и екзополизахарид от подбрения щам *Coelastrella* sp.

4. Изследване на биологичната активност на получените продукти от подбрения щам *Coelastrella* sp., в т.ч.:

4.1. Проучване в *in vitro* условия на антитуморната активност в моделна експериментална система на човешка туморна клетъчна линия от аденокарцином на шийката на матката (HeLa);

4.2. Опити за изясняване на механизма на антитуморно действие при HeLa туморни клетки, чрез прилагане на флуоресцентни методи на изследване (двойно интравитално оцветяване с флуорохроми и оцветяване с DAPI);

4.3. Изследване на антибактериална и антигъбна активности;

4.4. Определяне на антиоксидантния потенциал на алкохолен екстракт.

5. Оценка на биологичната активност и биотехнологичния потенциал на подбрения щам *Coelastrella* sp. за практиката.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

III.1. Водораслов материал. Изследванията са проведени с 4 щам микроводорасли от род *Coelastrella* - *Coelastrella* sp. BGV (щам от колекцията на Лаборатория “Експериментална алгология” при ИФРГ – БАН), *Coelastrella multistriata* var. *corcontica* 308, *Coelastrella multistriata* 309 и *Coelastrella vacuolata* 356 (предоставени от колекцията на Институт по Ботаника, град Требон (CCALA), Чешка академия на науките (ASCR, Třeboň).

III.2. Култивиране на микроводорасли, измервания и анализи. Култивирането на микроводораслите е осъществявано при стерилни условия, на съоръжения, конструирани в ИФРГ-БАН.

Луминистат – използван за поддържане на експерименталните щамове в хранителна среда при екстензивни условия - постоянна температура 20°C и осветеност 80 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$;

Блок за интензивно култивиране – използван за култивиране на микроводораслите в стъклени съдове с работен обем 200 mL при интензивни условия-предварително зададена температура, едностранно и/или двустранно осветяване (8000/16000 Lx), продухване с въздух, обогатен с 2-3% въглероден диоксид.

За култивиране на микроводораслите са използвани две хранителни среди - Blue-Green (BG11) и хранителна среда на Setlik (1967), модифицирана от Georgiev et al. (1978). В експериментите по получаване и изпитване на биологичната активност на продукти от водораслото *Coelastrella* sp. BGV е използвана хранителна среда на Setlik, модифицирана от Georgiev et al. (1978), базирайки се на данните на Драганова (2018), че щамът расте по-добре на тази среда в сравнение с BG11.

Биологичното състояние на културите се контролира ежедневно. Микроскопският контрол се осъществява със светлинен микроскоп NU 2 – Karl Zeiss–Jenna и Olympus BX51 с камера Olympus DP71 при увеличение до 780 $\times$.

III.2.1. Количеството на абсолютното сухо вещество (АСВ) на водораслото е определяно тегловно след отстраняване на солите и сушене на биомасата до постоянно тегло при 105°C.

III.2.2. Скоростта на растеж [μ] е изчислявана по формулата (Levasseur et al., 1993):

$$\mu = \frac{\ln(m_{t_2}/m_{t_1})}{t_2 - t_1}, \text{ -където } m_{t_1} \text{ е АСВ в началото на култивационния период (} t_1 \text{) - (} t_1=0 \text{) и } m_{t_2} \text{ е АСВ на първи и четвърти ден от култивирането (} t_2=1 \text{ и } t_2=4 \text{).}$$

III.2.3. Производителността на биомаса (ПБ) (суха биомаса, грам/литър на ден) е изчислявана по формулата:

$$\text{ПБ} = (\text{АСВ}_{t_2} - \text{АСВ}_{t_1}) / (t_2 - t_1),$$

където АСВ_{t_2} и АСВ_{t_1} представляват сухото тегло на биомасата във време t (дни) – ($t_2=5$ и $t_1=0$).

III.2.3.1. Съдържанието на хлорофил *a*, *b* и каротеноиди във водорасловата биомаса е определяно спектрофотометрично (λ - 665 nm за хлорофил *a*; λ -650 nm за хлорофил *b*; и λ -460 nm за каротеноиди), след екстракция с кипящ метанол и изчислявано по формулите на Maskinney (1941).

III.2.3.2. Съдържанието на общи белтъци е определяно по метода на Lowry (1951).

III.2.3.3. Въглехидратното съдържание е определяно по фенол-серния метод на Dubois et al. (1956).

III.2.3.4. Съдържанието на общи липиди е определяно по метод, описан от Петков (1990).

III.3. Газхроматографски-масспектрален анализ на липиден екстракт. Химичният състав на получената проба липиди е определен чрез газхроматографски – масспектрален анализ, след превръщането на мастните киселини в съответните им метилови естери.

Газхроматографският анализ е проведен на газов хроматограф с мас-селективен детектор PE Clarus680/SQ8S, оборудван с капилярен инжектор с електронен контрол на налягането и два газови клапана за проби; GC колона: PE-5MS (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m). Стационарна фаза - 5% Phenyl, 95% Methyl Siloxane.

Хроматографски условия: Мобилна фаза - Helium 5.0 (хелий); Мобилен фазов режим - постоянен поток - 0.9 мл/мин.; Температура на инжектора - 290°C; Режим на инжектиране - Сплит 15:1, Обем на инжектиране - ръчно - 1 μ L; Елуирането на съединенията се извършва със следната температурна програма: Начална температура - 80°C - задържане 1 мин.; Температурен градиент 1 - 8°/мин. до 140°C - задържане 0 мин.; Температурен градиент 2 - 4°/мин. до 210°C - задържане 0 мин.; Температурен градиент 3 - 6°/мин. до 270°C - задържане 4.0 мин.; Общо време за изпълнение - 40 мин. Температура на линията за трансфер на MSD - 270°C; Температура на източника на йон на MSD - 220°C; Забавяне на разтворител MSD - 4.0 мин.; MSD сканиране - m/z - 45 - 450 E + - от 4.0 до 40.0 мин.

Контролт, събирането и обработката на данни са извършени при използване на софтуер на GCMSD TurboMass v.6.1.0.1963.

III.4. Химична характеристика и състав на извънклетъчен полизахарид/и

III.4.1. Определяне на общо съдържание на уронови киселини. Анхидроуруновото съдържание в полизахаридната фракция е определено колориметрично с 3-хидроксифенил по метода на Blumenkrantz and Asboe-Hansen (1973) - с използване на D-GalA като стандарт (5.0-100.0 μ g/mL).

III. 4.2. Определяне на степен на естерификация. Полизахаридната проба е осапунена (0.5 M NaOH, 1 h) и след неутрализация (1 M HCl), количеството на

освобождения метанол е определено чрез комбиниран ензимно-колориметричен метод на Klavons and Bennett (1986). Анализът е извършен съгласно процедурата описана от Anthon and Barrett (2008), с използване на 4-амино-5-хидразино-1,2,4-триазол-3-тиол (Purpald®) като хромоген.

III.4.3. Определяне на ацетилно съдържание. Ацетилното съдържание е определено фотометрично по хидроксамовия метод на McComb and McCready (1957), с използване на β -D-глюкозопентаацетат ($24.0\text{--}120.0\text{ }\mu\text{g/mL}$) като стандарт.

III.4.4. Определяне на белтъчно съдържание. Белтъчното съдържание в полизахаридната проба е определено по багрилно-свързващия метод на Bradford (1976).

III.4.5. Инфрачервена спектроскопия с Фурие трансформация (ИЧ-ФТ спектроскопия). ИЧ спектри на изследваните ЕПЗХ са регистрирани на ИЧ-ФТ спектрофотометър Bruker в таблетка KBr.

III.4.6. Определяне на молекулна маса на полизахаридите. Молекулната маса е определена чрез HPSEC-RID хроматографска система Agilent 1220, при използвани пулланови стандарти ($0.59\times 10^4\text{--}78.8\times 10^4$), подвижна фаза $150\text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.0) и колона Agilent Bio SEC-3 (300 Å, $4.6\times 300\text{ mm}$, $3\text{ }\mu\text{m}$).

III.4.7. Определяне на монозахариден състав. Монозахаридният състав на изолираните полизахариди е определен чрез HPLC-UV хроматографска система Agilent 1220 по метода на Honda et al. (1989), с модификация на Yang et al. (2005). За целта, полизахаридите са хидролизирани (4M TFA (trifluoroacetic acid), 8 h при 110°C). Освободените монозахариди са дериватизирани с 1-фенил-3-метил-5-пиразолон (PMP) до UV-абсорбиращи продукти. Разделянето е проведено на колона Agilent TC-C18 ($5\text{ }\mu\text{m}$, $4.6\times 250\text{ mm}$) при подвижна фаза 50 mM фосфатен буфер ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--NaH}_2\text{PO}_4$, pH 6.9), с добавен ацетонитрил, в режим на градиентно елуиране (Yang et al., 2005).

III. 5. Приготвяне на проби от *Coelastrella* sp. BGV за изпитване на биологична активност

III.5.1. Културална среда с извънклетъчни отделения (КС). Използвана е култура в стационарна фаза на растеж. Клетъчната маса е отделяна след центрофугиране при 5000 rpm , а супернатантата е изсушавана лиофилно. Получената суха субстанция е суспендирана в стерилна дестилирана вода в необходимата концентрация.

III.5.2. Нискотемпературен воден екстракт (НТ). Леофилно сушена биомаса от *Coelastrella* sp. BGV е заливана с кипяща дестилирана вода в съотношение 1:8. След охлаждане до 40°C сместта е поставяна в хладилник (4°C) за 48 часа при периодично разбъркване. Клетъчната маса е отделяна след центрофугиране при 4000 rpm и водният екстракт е изсушаван лиофилно. Полученият сух нискотемпературен воден екстракт е суспендиран в стерилна дестилирана вода в необходимата концентрация.

III.5.3. Високотемпературен воден екстракт (ВТ). Леофилно сушена биомаса от *Coelastrella* sp. BGV е суспендирана в дестилирана вода в съотношение 1:8 и подгрявана на водна баня при температура на сместа $80\text{--}90^\circ\text{C}$ и постоянно разбъркване за 90 мин . След отделяне на клетъчната маса водният екстракт е изсушаван лиофилно. Полученият сух високотемпературен воден екстракт е суспендиран в стерилна дестилирана вода в необходимата концентрация.

III.5.4. Алкохолен екстракт (АЕ). Свежа биомаса от *Coelastrella* sp. BGV е заливана с 96% етанол в съотношение 1:10 и получената смес е подгрявана на водна баня при 50°C за 4 часа . Извлекът е филтруван и изпаряван до сухо на ротационен вакуумен изпарител при 60°C . Сухата субстанция е суспендирана в DMSO (подходящ разтворител на липофилни вещества, използван в биологичните опити с култивирани клетки) в желаната концентрация.

III.5.5. Маслни киселини (МК) и неосапуняеми вещества (НВ). Към 25-30%-ен алкохолен екстракт от *Coelastrella* sp. BGV е добавян 5% - ен разтвор на калиева основа в етилов алкохол в съотношение 1:1. Хидролизата е провеждана на обратен хладник в продължение на 4 часа при температурата на кипене на сместа. При завършване на осапунването, реакционната смес е охлаждавана до 20 - 25°C и разреждана с 3-4кратно количество вода и хексан при интензивно разбъркване. След разслояване двата слоя се разделят. Горният слой с оранжево-червен цвят съдържа неосапуняеми вещества – въглеводороди, фитол, стероли, каротеноиди, мастноразтворими витамини. Екстрактът е промиван с вода за отстраняване на етиловия алкохол и изпаряван до сухо. Сухата субстанция е суспендирана в DMSO в желаната концентрация. Долният тъмнозелен слой съдържа маслни киселини под формата на калиеви соли. След подкисляване до pH~2 с 10-15% H₂SO₄, калиевите соли на маслните киселини са превръщани в свободни маслни киселини, които са извличани с хексан. Хексанът е изпаряван и замества с етанол (за концентрация на пробата от 20 mg/mL). За превръщането на маслните киселини във водоразтворими натриеви соли, към пробата е добавен наситен разтвор на NaHCO₃.

III.5.6. Маслен екстракт (МЕ). За директна екстракция на каротеноиди (астаксантин), водорасловата суспензия е смесвана със слънчогледово олио в съотношение 1:1, при непрекъснато разбъркване за 48 часа на стайна температура. Съдържанието е изливано в делителна фуния и след разслояване е отделян долният слой. Горният слой е центрофугиран на 4000 rpm за 10 мин. и количеството пигменти е измервано спектрофотометрично при дължина на вълната 480 nm.

III.5.7. Изолране на извънклетъчни полизахариди (екзоползахариди - ЕПЗХ). Полизахаридите, отделени в културалната среда, са утаявани с охладен 96% етанол в съотношение 1:2 за 24 часа. Утайката е промивана трикратно с 65% етанол, изсушавана лиофилно и разтваряна в стерилна дестилирана вода. Концентрацията на въглехидрати е определяна по метода на Dubois et al. (1956).

III.6. Изследване на биологична активност на метаболити и екстракти от *Coelastrella* sp. BGV

III.6.1. Изследване на анти tumorна активност

HeLa туморни клетки. В опитите е използвана перманентна човешка ракова клетъчна линия HeLa от карцином на цервикса на матката. Клетките са култивирани в среда DMEM, обогатена с 10% фетален телешки серум и антибиотици (Penicillin и Streptomycin) при 37°C, 95% влажен въздух с 5% съдържание на CO₂. За провеждане на опити *in vitro*, клетките са дисоциирани от култивационния съд чрез трипсинизиране (Trypsin-EDTA), промивани с фосфатен буфериран физиологичен разтвор (PBS), чрез центрофугиране (1200 rpm), довеждани до желаната концентрация и посявани в 96- или 24-ямкови плаки в зависимост от метода на изследване. След 24 часа култивиране в CO₂-инкубатор за получаване на монослой, клетките са третираны (по схема) с водораслови продукти и клетъчната жизненост е определяна с МТТ тест.

BALB/c 3T3 миши фибробласти. Като тест система в опитите *in vitro* са използвани и нормални BALB/c 3T3 миши фибробласти (перманентна, нетуморогенна клетъчна линия от миши ембрионални фибробластни клетки). Култивирането на BALB/c 3T3 клетките и третирането им с водораслови проби са осъществени при условия и концентрации, както са описани за HeLa туморни клетки.

III.6.1.1. Антипролиферативен ефект на водораслови продукти - МТТ тест. Използван е МТТ тест, описан от Mossmann (1983). Методът се основава на образуването на формазанови кристали (с виолетов цвят) от живите клетки при метаболизирането на жълтата тетразолиева сол МТТ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Образуването на формазанови кристали е

пропорционално на дейността на митохондриалните ензими и съответно, на жизнеността на клетките.

HeLa туморни клетки (1×10^5 клетки/mL) в среда DMEM с 10% FBS са засявани в 96-ямкови плаки за тъканно култивиране в обем 100 μ L/ямка. След 24 часа инкубация в CO₂-термостат за добра адхезия и разстилане на клетките, средата се замества със 100 μ L прясна среда, съдържаща продукти от *Coelastrella* sp. BGV, в различни концентрации, и клетките се инкубират отново за 24 и 48 часа. Като контроли са използвани туморни клетки, култивирани само в среда (негативна контрола) и туморни клетки, култивирани в присъствие на антитуморния антибиотик Doxorubicin (положителна контрола). В края на 24-ти час и 48-ми час, култивационната среда е отстранявана и към всяка ямка са добавяни по 100 μ L разтвор на MTT (0.5 mg/mL). Клетките са инкубирани допълнително за 3 часа в термостат. Формазановите кристали са разтваряни със 100 μ L/ямка лизиращ разтвор (DMSO:Ethanol=1:1). Оптичната плътност (OD) на разтворения формазан е измервана при 570 nm и 620 nm (като референтна дължина) на ELISA спектрофотометър (TECAN, SunriseTM, Grödig/Salzburg, Austria). Клетъчната жизненост (cell viability) е изчислявана по формулата:

$$CV (\%) = OD_{570} (\text{опит}) / OD_{570} (\text{негативна контрола}) \times 100.$$

III.6.1.2. Цитоморфологични проучвания на HeLa туморни клетки, проведени с помощта на флуоресцентни методи.

III.6.1.2.1. Оцветяване с акридин оранж (АО) и етидиев бромид (EtBr) по метод на Wahab et al., 2009.

HeLa туморни клетки (1×10^5 клетки/mL) в хранителна среда DMEM с 10% FBS и антибиотици, са посявани върху стерилни стъклени ламели поставени на дъното в 24-ямкови плаки и култивирани 24 часа в CO₂-инкубатор за образуване на клетъчен монослой. На следващия ден клетките са третирани с водораслови продукти, и култивирани в CO₂-инкубатор при стандартни условия за нови 24 часа. Като контрола са използвани HeLa туморни клетки, култивирани само в среда върху стъклени ламели (негативна контрола) и туморни клетки култивирани в присъствие на Doxorubicin (5 μ g/mL)(позитивна контрола). След приключване на инкубацията, стъклените ламели са промивани двукратно с PBS с цел отстраняване на неадхерирали туморни клетки и оцветени със смес от равни обеми на флуоресцентни багрила (10 μ g/mL АО и 10 μ g/mL EtBr). Прясно оцветените туморни клетки са наблюдавани и фотографирани в рамките на 5-10 мин. след оцветяването на флуоресцентен микроскоп (Leica DM 5000B, Wetzlar, Germany) преди флуоресцентният цвят да започне да избледнява.

III.6.1.2.2. Оценка на ядрената морфология на HeLa туморни клетки, третирани с водораслови продукти от *Coelastrella* sp. BGV - Оцветяване с DAPI (4',6-диамино-2-фенилиндол) по процедура съгласно протокол и инструкции на производителя.

Култивирането на HeLa туморни клетки и третирането им с водораслови проби са осъществени при условия и концентрации, както са описани в **III.6.1.2.1.**

Оцветяването на клетките с DAPI е извършвано след фиксирането им с 3% параформалдехид. Пробите с третирани и нетретирани (контролни) HeLa клетки са покривани с Mowiol (водоразтворим хидроколоиден мукоадхезив на базата на поливинил алкохол) и монтирани върху предметни стъкла. Съхранявани са на тъмно до изследването им с флуоресцентен микроскоп (Leica DM 5000B, Wetzlar, Germany).

III.6.2. Изследване на антибактериална и антигъбна активности

III.6.2.1. Агар-дифузионен метод на Perez et al. (1990) (Метод на агаровите ямки). Използвани са тест-бактериите *Staphylococcus aureus* (Gram +) и *Escherichia coli* (Gram -) и гъбен патоген *Candida albicans*. Като положителна контрола са използвани

стандартни антибиотици - Gentamicin (0.1 mg/mL) за бактериалните щамове и Amphotericin B (0.1 mg/mL) за *Candida albicans*. Бактериалните щамове са посявани в хранителна среда МНА (Müller-Hinton Agar), а *Candida albicans* в среда Sabouraud (Sabouraud Dextrose Agar - SDA). 0.1 mL микробна суспензия (1.0×10^5 КОЕ/mL), отговаряща на концентрация 2×10^5 клетки/mL е посявана върху МНА агар, предварително разлят в петриеви панички с диаметър 100 mm. Гъбният щам (1.0×10^5 CFU/mL) е посяван повърхностно върху предварително разлята хранителна среда Sabouraud Dextrose Agar в същата концентрация (2×10^5 клетки/mL). Хранителна среда (МНА или Sabouraud), съдържаща 10% DMSO е използвана като негативна (отрицателна) контрола.

Във всяка петриева паничка с шаблон са правени по 6 ямки с диаметър 8 mm. Изходните разтвори на водорасловите проби са разреждани до концентрация 5 mg/mL. От всяка водораслова проба (метаболити, екстракти) са накапвани по 0.1 mL/ямка (500 µg/ямка), в 3 повторения. Петриевите панички са оставяни за 2 часа на 4°C за пре-дифузия на пробите и след това са поставяни в термостат при подходяща за растежа на патогените температура.

Антибактериалната и антигъбна активности на водорасловите продукти е отчитана по диаметъра (mm) на инхибиторните зони в агара след 24 часа инкубация на 37°C за бактериалните щамове и след 48 часа инкубация на 30°C за *Candida albicans*.

III.6.2.2. Диск-дифузионен метод на Essawi and Srour (2000). Използвани са 10 условно патогенни тест-микроорганизми представени от 9 бактериални щамове и един гъбен патогенен щам (*Candida albicans* NBIMCC 74). От бактериалните щамове 2 са Грам-положителни: *Bacillus cereus* NBIMCC 1085, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, а 7 са Грам-отрицателни - *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* NBIMCC 8954 (UPEC), *Escherichia coli* (EPEC) - клиничен изолат, *Pseudomonas aeruginosa* NBIMCC 3700, *Salmonella typhimurium* NBIMCC 3669, *Proteus mirabilis* NBIMCC 8747 и *Klebsiella pneumoniae* NBIMCC 3670.

Тест-микроорганизмите са посявани в съответните хранителни среди (описано в **III.6.2.1.**). По 25 µL от стерилизирани през бактериален филтър (45 µm) водораслови проби се нанасят върху стерилни хартиени дискове, които се поставят на повърхността на инокулираните с тест-микроорганизми агарови среди по схема. Като положителна контрола се използват напоени с Tetracyclin дискове (30 µL) за бактериалните щамове и Nystatin за гъбния патогенен щам. Експериментът се извършва в три повторения за всяка водораслова проба.

След 24-часово култивиране на бактериалните щамове при 37°C и 48-часово култивиране на *C. albicans* при 30°C, се отчитат антибактериалната и антигъбна активност по диаметъра (mm) на получените инхибиторни зони в агара.

III.6.2.3. Определяне на минимална инхибираща концентрация (МИК) по метод на микроразрежданията в течна среда, описан от Andrews (2001).

Предварително култивираните патогени (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*) са приравнявани към McFarland стандарт, еквивалентни на 1.0×10^5 CFU/mL за бактериите и 2.0×10^5 CFU/mL за *C. albicans*. 0.1 mL от съответната водораслова проба (5 mg/mL) се накапва в първата ямка на 96-ямкова плака, след което е правено серийно разреждане на пробата 1:1 със съответната течна хранителна среда за бактерии или за кандида. Към всяка ямка от една серия е накапвана бактериална или гъбна култура (0.1 mL/ямка). След култивиране за 24 часа при съответните условия се измерва оптичната плътност (OD₆₅₀) на ELISA спектрофотометър. Отчита се МИК - най-ниската концентрация (която съответства на най-голямото разреждане) на тествания водораслов продукт, която потиска видимия микробен растеж (липсва

мътност) след 24 часа инкубиране при 37°C (за бактериите) и след 48 часа при 30°C (за гъбата). Всеки експеримент се провежда в 3 повторения.

III.6.3. Антиоксидантна активност (АО) на алкохолен екстракт от *Coelastrella* sp. BGV

III.6.3.1. Определяне на общото съдържание на феноли (Singleton et al., 1999). Реакционната смес съдържа 100 µL етанолов екстракт; 1500 µL Folin-Ciocalteu реагент (разр. 1:10 с H₂O) и 1400 µL 7.5% Na₂CO₃. В контролната проба се съдържат 100 µL етанол; 1500 µL Folin-Ciocalteu реагент (разр. 1:10 с H₂O) и 1400 µL 7.5% Na₂CO₃. След разбъркване на Вортекс и инкубиране на тъмно за 30 мин. на стайна температура, интензитетът на оцветяването се измерва при λ = 765 nm. Общото съдържание на феноли се изчислява от стандартна крива като еквиваленти галова киселина (GAE).

III.6.3.2. Определяне на общото съдържание на флавоноиди (Chang et al., 2002). Приготвя се реакционна смес, която съдържа 125 µL етанолов екстракт; 875 µL етанол; 50 µL 10% AlCl₃; 50 µL 1M CH₃COOH. В контролната проба се внасят 1000 µL етанол; 50 µL 10% AlCl₃; 50 µL 1M CH₃COOH. Пробите се инкубират за 30 мин. на стайна температура на светло. Интензитетът на оцветяването се измерва при λ = 415 nm. Общото съдържание на флавоноиди се изчислява като кверцетинови еквиваленти (QE), по предварително изготвена стандартна крива.

III.6.3.3. Определяне на тотална антиоксидантна активност (ТАА) (Prieto et al., 1999). Методът се базира на редукцията на Mo⁺⁶ до Mo⁺⁵ и последващото формиране на зелен фосфомолибдатен комплекс. Използва се реакционна смес от 250 µL алкохолен екстракт и 2500 µL реактив (0.6 M H₂SO₄, 28 mM NaH₂PO₄, 4 mM (NH₄)₆Mo₇O₄). Контролата съдържа 250 µL етанол и 2500 µL реактив. След инкубиране на пробите за 90 мин. при 90°C, реакцията се прекратява в ледена баня. Интензитетът на оцветяването се измерва при λ = 695 nm. Тоталната антиоксидантна активност (ТАА) се изчислява по формулата:

$$\text{ТАА [mM/g екстракт]} = \frac{E_{695} \times V}{\epsilon \times g}$$

V – mL етанол, в които е разтворен екстрактът

ε – моларен абсорбционен коефициент на токоферол (ε = 4)

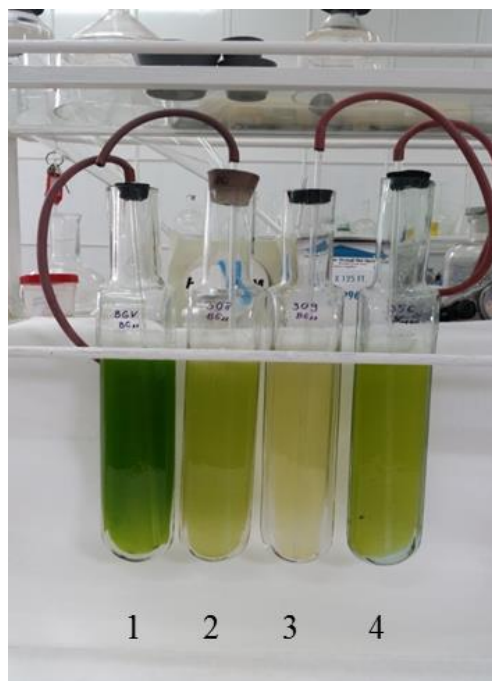
g – тегло на сухия етанолов екстракт

III.7. Статистически анализ. Всички опити са проведени в по три повторения. Резултатите са представени като средни стойности и стандартни отклонения (±SD). Статистически значимата разлика между отделните третирания е установена чрез еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA), последван от Bonferroni's тест чрез използването на GraphPAD PRISM софтуер, Версия 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Стойностите на P* < 0.05 са приемани за значими.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

IV.1. Култивиране на зелени микроводорасли от род *Coelastrella* sp. BGV.

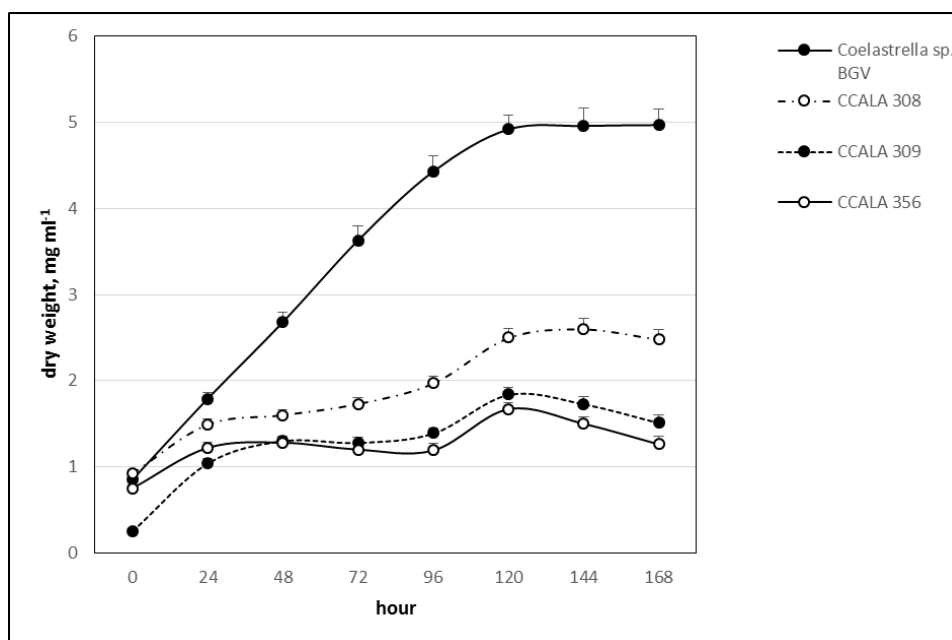
Култивирането е проведено на блок за интензивно култивиране при 8000 Lx осветеност на повърхността на съдовете, температура 28°C, аериране с въздух обогатен с 2-3% въглероден диоксид и хранителна среда BG11 за 168 часа (Фиг. 1).



Фигура 1. Култури от: 1 - *Coelastrella* sp. BGV, 2 - *Coelastrella multistriata* var. *corcontica* (CCALA 308), 3 - *Coelastrella multistriata* var. *multistriata* (CCALA 309) и 4 - *Coelastrella vacuolata* (CCALA 356).

Проследен е растежът и е определен биохимичният състав (белтъци, въглехидрати, липиди и пигменти) на биомасата в експоненциална и стационарна фаза на растеж на четири щама от род *Coelastrella* - *Coelastrella* sp. BGV (български щам), *Coelastrella multistriata* var. *corcontica* (CCALA 308), *Coelastrella multistriata* (CCALA 309) и *Coelastrella vacuolata* 356 (CCALA 356). За краткост, в последващия текст щамовете от чешката колекция са представени като *Coelastrella* 308, *Coelastrella* 309 и *Coelastrella* 356, съответно.

IV.1.1. Продуктивност на биомаса и специфична скорост на растеж. Най-висока плътност на водорасловата суспензия (4.97 g/L) и продуктивност на биомаса (0.814 g/L/d) се достига от *Coelastrella* sp. BGV, при скорост на растеж [μ] 0.745 и 0.413 ($t_2=1$ и $t_2=4$, съответно) (Табл. 1). При тази култура линейният растеж се запазва до 120-ти час (Фиг. 2). Достигнатата максимална плътност при *Coelastrella* 308 е 2.5 g/L, при *Coelastrella* 309 е 1.84 g/L и при *Coelastrella* 356 е 1.67 g/L. При последните 3 култури се регистрира забавяне на растежа от 48-ми до 96-ти час, последвано от нов линеен растеж до 120-ти час.



Фигура 2. Растежни криви на *Coelastrella* sp. BGV, *Coelastrella multistriata* var. *corcontica* (CCALA 308), *Coelastrella multistriata* (CCALA 309) и *Coelastrella vacuolata* 356 (CCALA 356).

Таблица 1. Изменение на количеството биомаса (ACB, g/L) с времето на култивиране (дни), скорост на растеж [μ] и продуктивност на биомаса (g/L/d) на *Coelastrella* sp. BGV, *Coelastrella* 308, *Coelastrella* 309 и *Coelastrella* 356.

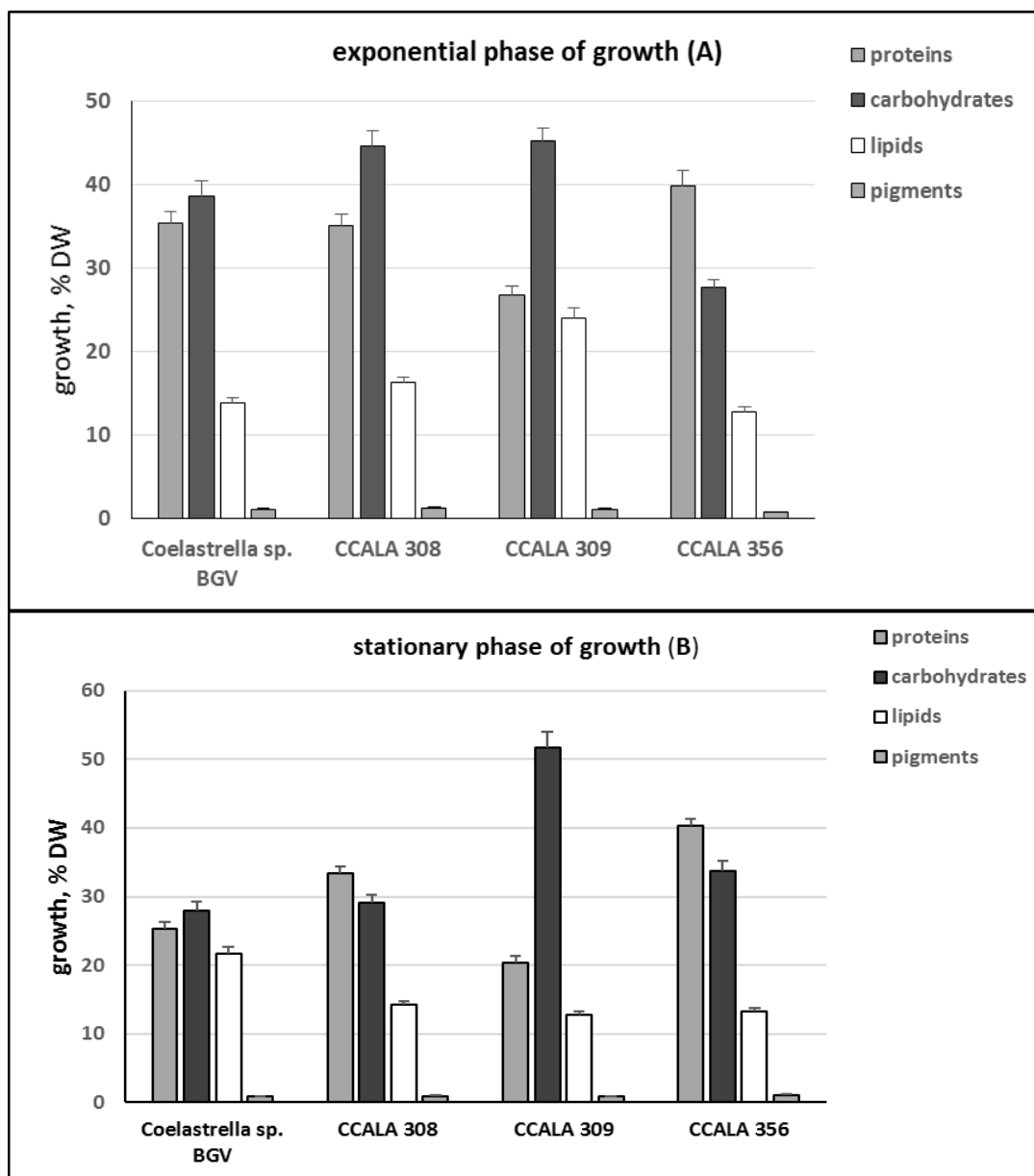
ден	<i>Coelastrella</i> sp. BGV	<i>Coelastrella</i> 308	<i>Coelastrella</i> 309	<i>Coelastrella</i> 356
ACB, g/L				
0	0.85	0.92	0.25	0.75
1	1.79	1.49	1.04	1.22
4	4.43	1.97	1.39	1.19
5	4.92	2.50	1.84	1.67
7	4.97	2.48	1.51	1.26
[μ]				
$\mu_{t_2=1}$	0.745	0.482	1.425	0.486
$\mu_{t_2=4}$	0.413	0.190	0.429	0.122
Продуктивност на биомаса, g/L/d				
	0.814	0.316	0.318	0.184

При оптимизирано двуфазно култивиране на индийски изолат на *Coelastrella* sp. са постигнати [μ] 0.56 и продуктивност на биомаса 302.0 mg/L/d (Minhas et al., 2020). При други два индийски изолата, *Coelastrella oocystiformis* отглеждана в среда BG11, при 25°C, 5000 Lx и 3% CO₂ и *Coelastrella* sp. M-60 отглеждана в среда BG11, 25°C,

1500 Lx и фотопериод 12:12 часа, продуктивността на биомаса е 89 mg/L/d и 56.3 ± 0.9 mg/L/d, съответно (Iyer et al., 2015; Karpagam et al., 2015).

IV.1.2. Биохимичен състав на биомасата. Съдържанието на основните компоненти на биомасата на изследваните 4 щама *Coelastrella*, в експоненциална и стационарна фаза на растеж на водораслите е представено на Фигура 3.

В експоненциална фаза (Фиг. 3А), съдържанието на белтъци е приблизително еднакво (около 35% от АСВ) при три от изследваните щама, и само при *Coelastrella* 309 е по-ниско - 26.8%. При отделните щамове съдържанието на въглехидрати е различно, като е най-високо при *Coelastrella* 309 и *Coelastrella* 308, съответно 45.2% и 44.6% от АСВ и най-ниско при *Coelastrella* 356 – 27.6% от АСВ. Изследвания на Драганова (2018) показват, че в зависимост от условията на култивиране, количеството на въглехидратите на *Coelastrella* sp. BGV се променя от 35.8 до 68.2% от АСВ. Iyer et al. (2015) установяват 44% въглехидрати при *Coelastrella oocystiformis*.



Фигура 3. Биохимичен състав на *Coelastrella* sp. BGV, *Coelastrella multistriata* var. *corcontica* (CCALA 308), *Coelastrella multistriata* (CCALA 309) и *Coelastrella vacuolata* (CCALA 356) в експоненциална (А) и стационарна (В) фаза на растеж.

По отношение на липидите, стойностите при *Coelastrella* sp. BGV, *Coelastrella* 356 и *Coelastrella* 308 варират в тесни граници – от 12.8 до 16.2% от АСВ, а при *Coelastrella* 309 стойността е по-висока - 24.0%. Съдържанието на липиди в биомасата на *Coelastrella* sp. BGV в експоненциална фаза на растеж (13.9%) е близко до това на терморезистентния щам *Coelastrella* sp. F50 и на *Coelastrella* sp. M-60 (16% от АСВ) в ранна стационарна фаза (Hu et al., 2013, Karagam et al., 2015). Общото количество на пигменти (хлорофил *a* + хлорофил *b* + каротеноиди) варира от 0.7% (*Coelastrella* 356) до 1.3% от АСВ (*Coelastrella* 308). При българския щам пигментите са 1.14% от АСВ. За сравнение Iyer et al. (2015) установяват 24.6%, 44%, 27% и 2%, съдържание на протеини, въглехидрати, липиди и каротеноиди съответно в биомасата на *Coelastrella oocystiformis*.

В стационарна фаза на растеж (Фиг. 3В), съдържанието на белтъци е най-високо при *Coelastrella* 356 - 40.3%, следвано от това при *Coelastrella* 308 – 33.4%, като за *Coelastrella* sp. BGV отчетеното количество е 25.3% от АСВ. Съдържанието на белтъци (27%) при *Coelastrella oocystiformis* (Iyer et al., 2015) култивирана в среда BG11 и 3% CO₂ е съизмеримо с установеното за *Coelastrella* sp. BGV. Два от изследваните щамове *Coelastrella* sp. BGV и *Coelastrella* 308 са с изравнено съдържание на въглехидрати, съответно 28 и 29.1%. По-високи стойности са отчетени за щам *Coelastrella* 356 - 33.8% и най-високи за *Coelastrella* 309 – 51.7% от АСВ. В тази фаза липидното съдържание е най-високо в биомасата на българския щам (21.6%). За разлика от експоненциална, в стационарна фаза на растеж трите щамове от чешката колекция са с изравнено съдържание на липиди – 13-14% от АСВ. И при четирите изследвани щамове, съдържанието на пигменти в стационарна фаза е около 1% от АСВ.

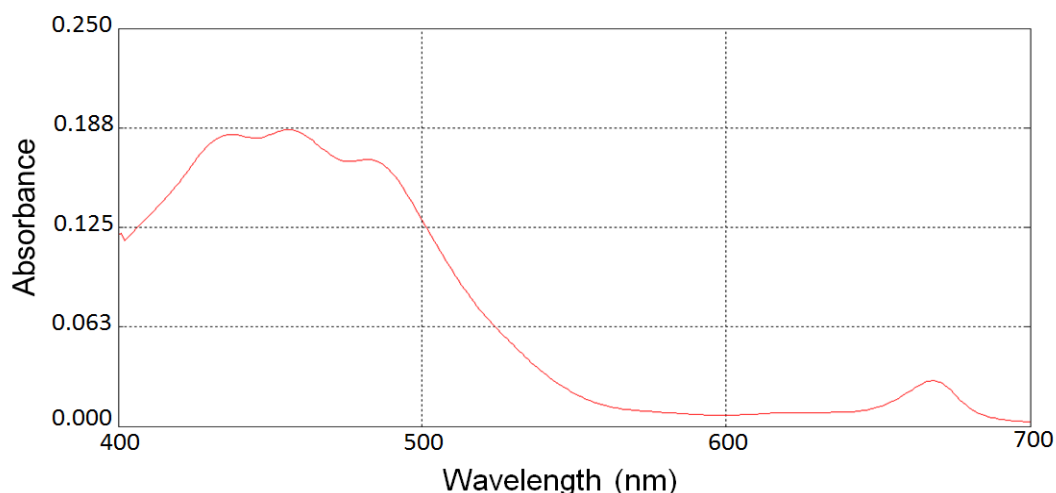
Драганова (2018) установява промяна в съдържанието на липиди от 17.7% до 36.5% от АСВ в ранна стационарна фаза при *Coelastrella* sp. BGV, в зависимост от концентрацията на хранителната среда. Процентът на липидите е най-висок при култивиране на водораслото в 1/8 среда на Setlik (1967), модифицирана от Georgiev et al. (1978), с най-ниска концентрация на хранителните елементи. При *Coelastrella* sp. F50, култивирана в модифицирана Bold 3N среда и двоен стрес (високи солева концентрация и осветяване), съдържанието на липиди нараства от 16 ± 1.0 до $22 \pm 1.7\%$ от сухото тегло, но продуктивността на биомаса намалява от 200 ± 4.7 на 134 ± 9.0 mg/L/d (Hu et al., 2013). При *Coelastrella* sp. QY01, отглеждана в среда BG11 с добавени отпадни води в различни пропорции, обаче, съдържанието на липиди е приблизително еднакво във всички култури, и се движи в границите от 22.4% до 25.5% (Luo et al., 2016). Промяна в биохимичния състав (липиди, протеини, въглехидрати) на биомасата при зеленото микроводорасло *Coelastrella oocystiformis* в зависимост от количеството CO₂ съобщават Iyer et al. (2015). Проучването на Razoooki et al. (2020) също показва, че видът и количеството на въглеродния източник са ключов фактор за продуктивността на липиди, протеини и въглехидрати от *Coelastrella* MN923012. Дозираното и повишено подаване на разтвор на CO₂ в хранителната среда увеличава съдържанието на липиди и протеини (20.3% и 41.5%, съответно) и намалява съдържанието на въглехидрати (30.1%) в сравнение с контролата (липиди 14.2%, протеини 27.7% и въглехидрати 50.7%). Освен това повлиява състава и повишава количеството на наситени и ненаситени мастни киселини.

Установените промени в химичния състав на биомасата на 4-те изследвани щамове в двете фази на растеж може да обясним с физиологичните особености и различните адаптивни възможности на отделните щамове към намаляване на хранителните ресурси при по-дълго култивиране.

Получените резултати показват, че *Coelastrella* sp. BGV има висок растежен потенциал и балансиран състав на биомасата (експоненциална/стационарна растежна фаза: белтъци – 35.3/25.3%, въглехидрати – 38.7/28%, липиди – 13.9/22% и пигменти – 1.14/1.00% от АСВ). При едни и същи култивационни условия, българският щам натрупва от 2 до 3 пъти по-голямо количество биомаса, а от там и продуктивността на компонентите на биомасата е в пъти по-висока, което го прави по-перспективен в биотехнологично отношение в сравнение с останалите изследвани щамове *Coelastrella*. Това определи изборът на *Coelastrella* sp. BGV за обект на последващите изследвания.

IV.2. Характеризиране на маслен екстракт, мастни киселини и екзополизахарид от *Coelastrella* sp. BGV

IV.2.1. Абсорбционен спектър на маслен екстракт (МЕ) от *Coelastrella* sp. BGV. В нашите експерименти е получен маслен екстракт от зеленото микроводорасло *Coelastrella* sp. BGV чрез метод за директно извличане с растително масло (слънчогледово олио). Абсорбционният спектър на МЕ (Фиг. 4) показва абсорбция в диапазона 400–500 nm с максимум при 460 nm дължина, което е индикация за наличие на каротеноиди и най-вече на астаксантин.



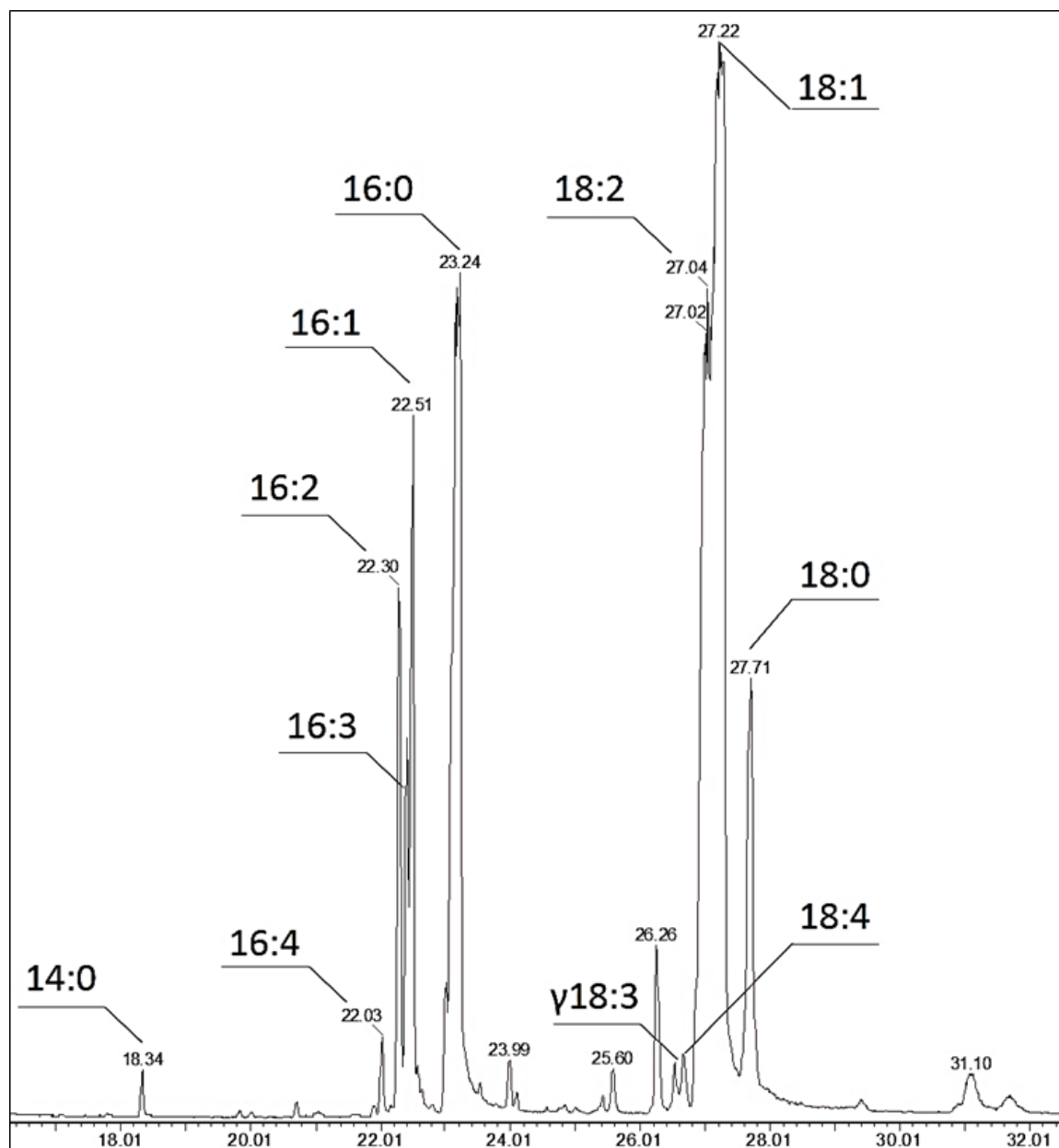
Фигура 4. Абсорбционен спектър на маслен екстракт от *Coelastrella* sp. BGV, получен чрез директна екстракция със слънчогледово олио.

Резултатите ни са в съответствие с други данни в литературата. Kang and Sim (2008), използвайки растителни масла, идентифицират астаксантин в екстракт от култура на *Haematococcus* с абсорбционен максимум при 474 nm. Наличието на малък пик в областта от 700 nm, авторите свързват с присъствие на друг вид маслоразтворими пигменти, съдържащи се в масления екстракт, например хлорофил. Предимствата на растителни масла, използвани за получаване на екстракти обогатени с каротеноиди е, че са добра бариера срещу протичащи окислителни процеси, не се налага отделяне на каротеноидите от биоразтворителя и могат да се използват директно в различни търговски продукти (Rao et al., 2007). Abe et al. (2007) показват, че водораслов екстракт от *Coelastrella striolata* var. *multistriata* съдържащ каротеноидите кантаксантин, астаксантин и β -каротен има силен антиоксидантен потенциал при използване в хранителни продукти.

IV.2.2. Съставът на мастни киселини в липиден екстракт, получен от зеленото микроводорасло *Coelastrella* sp. BGV е определен чрез използване на газов

хроматограф с мас-селективен детектор (GC-MS PE Clarus680/SQ8S), при хроматографски условия на анализ подробно посочени в раздел Материал и Методи.

Получената GC-MS хроматограма е анализирана при използване на вътрешен стандарт и база данни. Определени са качественият и количественият състав (% м/м от общото съдържание на мастни киселини в пробите) на мастните киселини във водорасловата проба. Резултатите са представени на Фигура 5 и Таблица 2.



Фигура 5. Газова хроматограма на метилови естери на мастни киселини от *Coelastrella* sp. BGV.

Таблица 2. Качествен и количествен състав на мастни киселини от *Coelastrella* sp. BGV.

Мастна киселина		Формула	Тип	Позиции на двойни връзки	RT	%, m/m
код	Наименование					
Наситени МК - Saturated fatty acids (SFA)						
14:0	Тетрадеканова (Миристинова)	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	-	-	18.34	0,4
16:0	Хексадеканова (Палмитинова)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	-	-	23.24	19,2
18:0	Октадеканова (Стеаринова)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	-	-	27.71	6,8
Количество наситени МК						26,4
Мононенаситени МК- Monounsaturated fatty acids (MUFA)						
16:1	Хексадеценова (Палмитолеинова)	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	ω-7	Δ ⁹	22.51	6,1
18:1	Октадеценова (Олеинова)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	ω-9	Δ ⁹	27.22	31,7
Количество мононенаситени МК						37,8
Полиненаситени МК- Polyunsaturated fatty acids (PUFA)						
16:2	Хексадекадиенова	C ₁₆ H ₂₈ O ₂	ω-6	Δ ^{7,10}	22.3	4,7
16:3	Хексадекатриенова	C ₁₆ H ₂₆ O ₂	ω-3	Δ ^{7,10,13}	22.42	3,2
16:4	Хексадекатетраенова	C ₁₆ H ₂₄ O ₂	ω-3	Δ ^{4,7,10,13}	22.03	0,6
18:2	Октадекадиенова (Линолова)	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	ω-6	Δ ^{9,12}	27.04	25,9
γ- 18:3	γ-Октадекатриенова (γ-Линоленова)	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	ω-6	Δ ^{6,9,12}	26.54	0,6
18:4	Октадекатетраенова	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	ω-3	Δ ^{6,9,12,15}	26.67	0,7
Количество полиненаситени МК						35,7
Общо количество МК						99,9

* Първо е изписано наименованието по IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), а в скоби е дадено тривиалното наименование

Идентифицираните мастни киселини са класифицирани в наситени мастни киселини (SFA) (миристинова, палмитинова и стеаринова киселини), мононенаситени мастни киселини (MUFA) (палмитолеинова, олеинова киселина) и полиненаситени мастни киселини (PUFA) (линолова, хексадекадиенова, хексадекатриенова, хексадекатетраенова, γ-линоленова и октадекатетраенова). Dimitrova et al. (2018) установяват 6 основни мастни киселини при *Coelastrella* sp. BGV определени след газово хроматографски анализ: миристинова (14:0), палмитинова (16:0), стеаринова (18:0), олеинова (18:1), линолова (18:2), алфа-линоленова (α-18:3). Установена е също една неидентифицирана мастна киселина. Настоящото проучване е по-разширено изследване на мастно киселинния състав на *Coelastrella* sp. BGV.

От Таблица 2 и Фигура 5 се вижда, че в липидния екстракт от *Coelastrella* sp. BGV са идентифицирани 11 мастни киселини. В най-голямо количество и в низходящ ред са представени олеинова (C18:1), линолова (C18:2) и палмитинова (C16:0) мастни киселини – съответно 31.7, 25.9 и 19.2 (% m/m). Октадеканова (стеаринова) (18:0), хексадеценова (палмитолеинова) (16:1), хексадекадиенова (16:2) и хексадекатриенова

(16:2) са 6.8, 6.1, 4.7 и 3.2 (% m/m) респективно, а останалите тетрадеканова (миристинова), хексадекатетраенова, γ -октадекатриенова (γ -линоленова) и октадекатетраенова МК са в количества под 1%.

Общите наситени мастни киселини представляват 26.4% от всички мастни киселини в изследваните проби, като в най-висок процент е представена хексадеканова (палмитинова) МК - 19.2%. Общите мононенаситени мастни киселини (MUFA) представляват 37.8%, а полиненаситените (PUFA) МК са 35.7%. Изводът, който може да направим е, че липидният екстракт от *Coelastrella* sp. BGV съдържа над 70% ненаситени МК като съотношението на моно- и полиненаситените МК е 1:1. Количеството на мононенаситена - олеинова (C18:1) и полиненаситена - линолова (C18:2) е над 50% от всички мастни киселини в изследваните проби. Получените от нас резултати са подобни, на данните съобщени от други автори, в които ненаситените олеинова и линолова киселини и наситената палмитинова киселина присъстват при водораслите от род *Coelastrella*. Наблюдават се обаче, качествени и количествени различия в химичния състав на мастни киселини при различните щамове, както и при един и същ щам в зависимост от условията на култивиране, хранителната среда, температура, светлина, CO₂, pH, сезонност и др. (Abe et al., 2007; Li et al., 2011; Zhu et al., 2013; Iyer et al., 2015; Dimitrova et al., 2018). В изследването на Dimitrova et al. (2018) например, съдържанието на неидентифицираната мастна киселина, за която авторите предполагат, че е мастна киселина с 16 въглеродни атома и повече от една двойна връзка (вероятно 16:2 или 16:3), варира в широки граници в зависимост от условията на култивиране. Количеството на палмитинова киселина варира от 15.2% при 30°C и 8 000 Lx до 53.5% при 35°C и 8000 Lx. Значително намалява съдържанието на олеиновата киселина при 30°C и едностранно осветление. Количеството на линоловата киселина се увеличава двойно при 25°C и двустранно осветление и намалява при 20°C. Най-съществена промяна е отчетена в съдържанието на палмитинова, олеинова и α -линоленова киселини в тесен температурен (30-35°C) диапазон (Драганова, 2018).

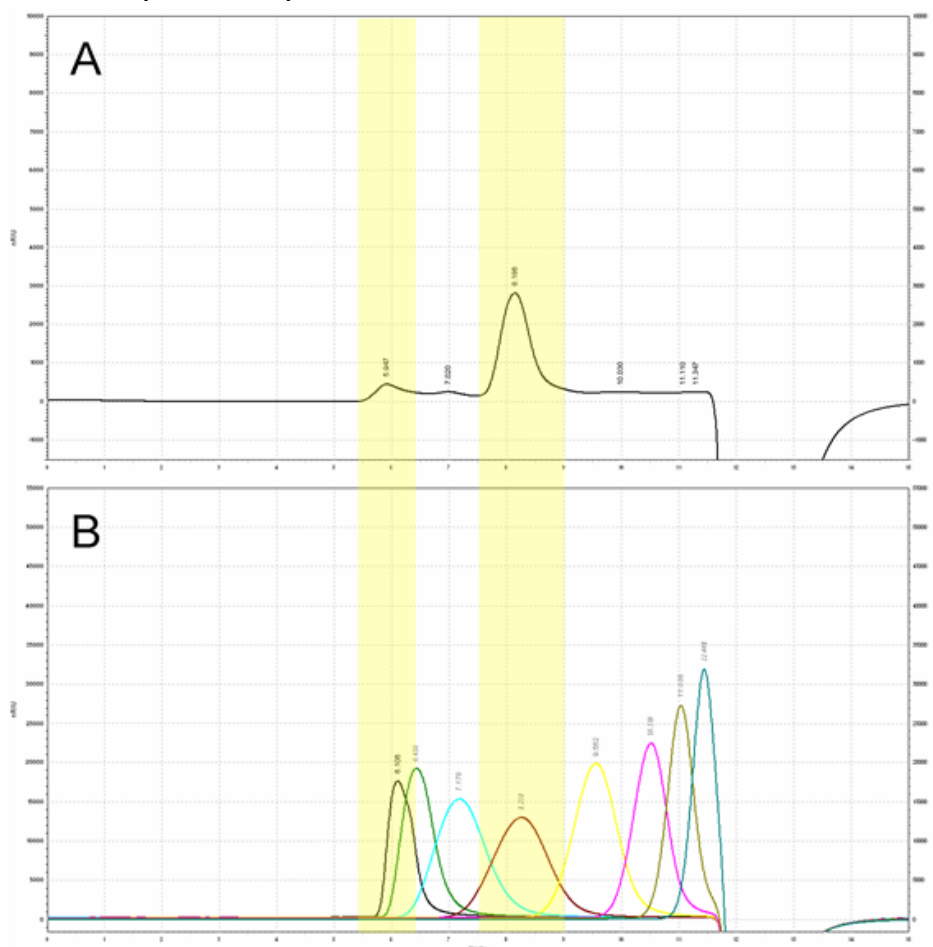
Iyer et al. (2015) анализират профила на мастните киселини на *Coelastrella oocystiformis* (Мумбай, Индия) също чрез GC-MS. Авторите съобщават, че основните мастни киселини, присъстващи в зелените клетки, са Undecanoic acid, Tricosanoic acid, Hexadecanoic acid, 9,12-Hexadecadienoic acid, 7,10,13-Hexadecatrienoic acid, 4,7,10,13 - Hexadecatetranic acid, 9-Octadecenoic acid, 9,12-Octadecadienoic acid, γ -linolenic acid, 9,12,15-Octadecatrienoic acid, cis-6,9,12,15-Octadecatetraenoic acid.

Abe et al. (2007) установяват, че микроводораслото *Coelastrella striolata* var. *multistriata* съдържа 8 мастни киселини с 16 и 18 въглеродни атома. Както наситените, така и ненаситените МК присъстват и в двата вида клетки на водораслото (зелени и червено-оранжеви). От наситените МК преобладава палмитинова киселина (16:0), а от ненаситените - полиненаситената линолова (18:2) и мононенаситената олеинова киселина (18:1). Червено-оранжевите водораслови клетки произвеждат по-голямо количество мастни киселини (общо съдържание на мастни киселини: 319 mg/g ACB), за сметка на олеиновата киселина (113.4 mg/g ACB).

Профилът на МК на *Coelastrella* sp. QY01 (новоизолиран щам от сладководно езеро), култивиран в BG11 среда (в присъствие на различни концентрации на отпадни води), е представен главно от палмитинова киселина (C16: 0), линолова киселина (C18: 2) и линоленова киселина (C18:3), в количество 23.8–30.8%, 11.9–20.8% и 40.5–53.8% от общото съдържание на мастни киселини, т.е преобладават ненаситените МК (Luo et al., 2016).

IV.2.3. Химична характеристика и състав на извънклетъчен полизахарид

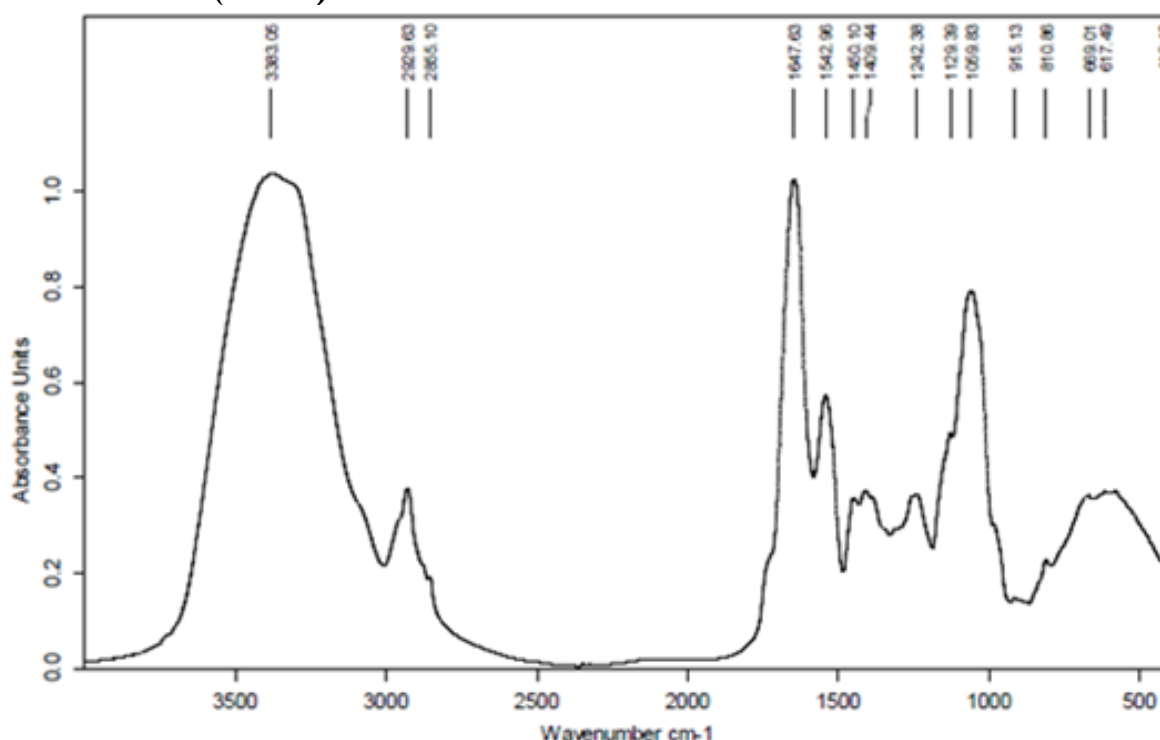
IV.2.3.1. Определяне на молекулната маса на екзополизахариди, получени от *Coelastrella* sp. BGV чрез HPSEC-RID хроматографска система Agilent 1220 при условия подробно посочени в раздел Материали и методи. Полученият елуационен профил на полизахаридите е представен на Фиг. 6.



Фигура 6. HPSEC елуационен профил на екзополизахариди от *Coelastrella* sp. BGV. А – екзополизахариди; В – пулуланови стандарти. Молекулни маси на използваните стандарти – отляво надясно: 78.8×10^4 , 40.4×10^4 , 21.2×10^4 , 11.2×10^4 , 4.73×10^4 , 2.28×10^4 , 1.18×10^4 , 0.59×10^4 Da.

Разпределението на ЕПЗХ по молекулна маса показва наличие на три полизахаридни фракции (Фиг. 6А). Най-голямо е количеството (72.5%) на фракцията с молекулна маса 11.5×10^4 Da (маркирана в жълто зона на ясно изразен пик). Пред нея с по-кратко време на задържане се елуират две фракции (два малки пика) с по-висока молекулна маса, но в по-малко количество в пробата – 72.4×10^4 (11.8%) и 30.7×10^4 (5.7%), съответно. Получените данни показват, че изолираният ЕПЗХ от *Coelastrella* sp. BGV е нискомолекулен.

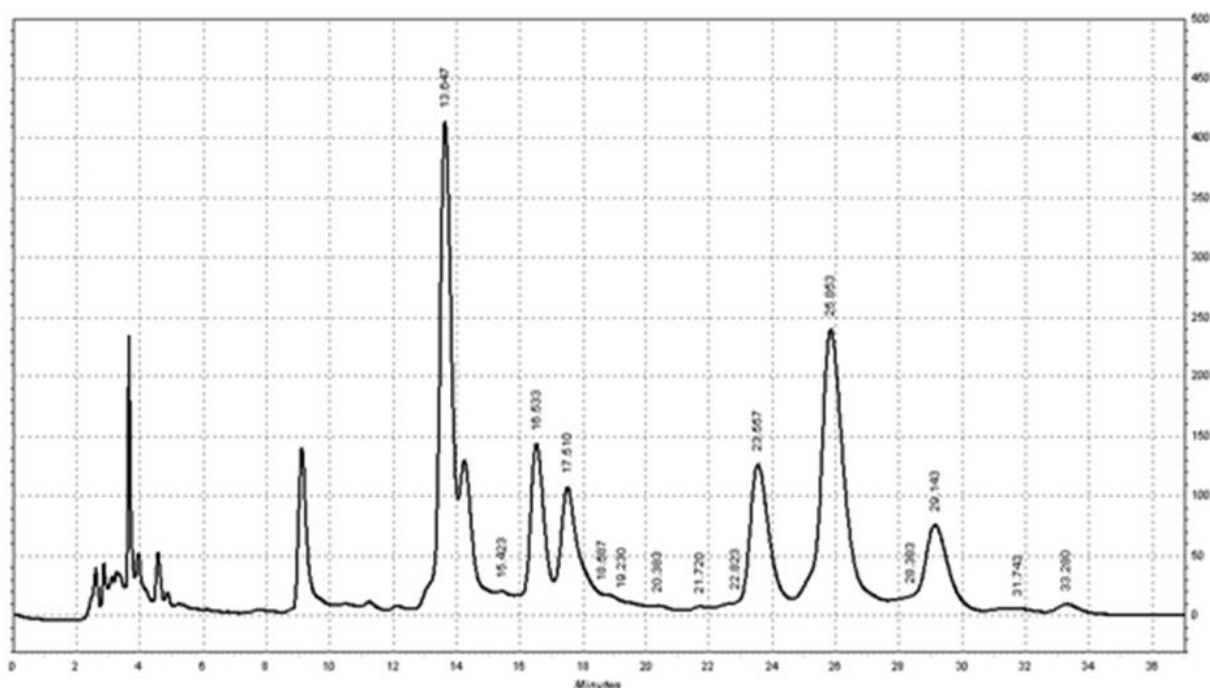
IV.2.3.2. Снет е ИЧ-ФТ спектър на ЕПЗХ на ИЧ-ФТ спектрофотометър Bruker в таблетка KBr (Фиг. 7).



Фигура 7. ИЧ-ФТ спектър на ЕПЗХ от *Coelastrella* sp. BGV.

Полученият спектър е анализиран в съответствие с налична база данни. Направено е отнасяне на отделните ивици на поглъщане с присъствието на определени функционални групи. В спектъра се установяват ивици за наличие на: свободни хидроксилни групи (О-Н и N-H валентни трептения в интервала от 3400-3225 cm⁻¹); на NH₃⁺ (аминна група) при 3383 cm⁻¹; на CH₂ (метиленова) група при 2929 cm⁻¹ (валентни вибрационни трептения на връзката C-H от CH₂ групата); за -NH₂ група от първичен амин и N-H група от амид при 1650-1550 cm⁻¹, присъствие на аминокиселини и/или белтъчна компонента (две ивици при 1647 cm⁻¹ и 1542 cm⁻¹); сигнали (1409 cm⁻¹) за C-N връзката на амини и амиди (в областта 1400-1418 cm⁻¹). В спектъра не се откриват ивици, характерни за наличие на сулфатни естери в полизахарида. От представените резултати може да приемем, че полученият ИЧ-ФТ спектър на ЕПЗХ от *Coelastrella* sp. BGV е типичен за полизахарид (или протеогликан), съставен преимуществено от неутрални захари.

IV.2.3.3. Определяне на монозахариден състав на изолирания екзоползахарид чрез HPLC-UV хроматографска система Agilent 1220, след хидролиза на ЕПЗХ и дериватизация на освободените монозахариди до UV-абсорбиращи продукти (HPLC-UV хроматограма – Фиг. 8). Условиата са подробно посочени в раздел Материали и методи.



Фигура 8. HPLC-UV хроматограма на PMP (1-фенил-3-метил-5-пиразолон) - производни на монозахариди, получени от ЕПЗХ от *Coelastrella* sp. BGV.

При проведения хроматографски анализ бяха идентифицирани два монозахарида – галактоза и фукоза, като в пробата присъстват и други 5 неидентифицирани монозахарида (Табл. 3). На базата на проведените анализи и произхода на пробата, може да предположим, че някои от неидентифицираните монозахариди са неацетилирани галактозамин и/или глюкозамин, или че пробата е протеогликан. Не може да се изключи наличието и на анхидрозахари (напр. 3,6-анхидро-D/L-галактоза). Необходими са допълнителни изследвания с включване на допълнителни стандарти (аминозахари, рибоза, дезоксизахари).

Таблица 3. Химична характеристика на екзополизахарид, изолиран от *Coelastrella* sp. BGV (w/w %).

Белтък	7.14
Монозахариди	
Рамноза (Rha)	-
Арабиноза (Ara)	-
Галактоза (Gal)	1.7
Глюкоза (Glc)	-
Маноза (Man)	-
Ксилоза (Xyl)	-
Фукоза (Fuc)	0.4
Галактуронова киселина (GalA)	-
Глюкуронова киселина (GlcA)	-
Общо съдържание на уროнови киселини	4.5
Степен на метоксилиране, mol%	0.74 µg/mL
Съдържание на ацетилни групи	не е намерено

Bernaerts et al. (2018) сравняват десет вида микроводорасли, които представляват търговски интерес като функционална храна или хранителни добавки, по отношение на състав на биомасата, клетъчно-свързани ПЗХ и ЕПЗХ и техния химичен състав (монозахарен профил, съдържание на уროнови киселина и сулфати). Те установяват ЕПЗХ само при четири вида микроводорасли (*Porphyridium cruentum*, *Odontella aurita*, *Arthrospira platensis* и *Chlorella vulgaris*). Най-високо съдържание на ЕПЗХ е установено в *P. cruentum*, червено микроводорасло, което е известно със сулфатирани извънклетъчни полизахариди (Arad and Levy-Ontman, 2010). Други автори също съобщават за ЕПЗХ от видове на *Chlorella* sp. (Morineau-Thomas et al., 2002; Xiao and Zheng, 2016).

От *Chlorella pyrenoidosa*, Sheng et al. (2007) изолират ПЗХ, съставен от 2 ПЗХ фракции (означени CPPS I и CPPS II) с молекулна маса съответно 69658 Da и 109406 Da. Монозахаридният профил на двете фракции, определен с газова хроматография показва еднакъв качествен и различен количествен състав. И двете ПЗХ фракции съдържат рамноза (rhamnose), маноза (mannose), глюкоза (glucose) и галактоза (galactose) и до 10% неизвестен монозахарид/и. Галактозата (46.5%) е доминиращ монозахарид във фракция CPPS I, а рамнозата (37.8%) – във фракция CPPS II. Hue et al. (2003) и Xie et al. (2005) получават три полизахаридни фракции от *Dunaliella salina* чрез екстракция с гореща вода, йонообменно пречистване (DEAE-32 йонообменна колона) и гел-филтрация (Sephadex G-100). Трите фракции са определени като глюкан, сулфатен протеогликан и сулфатен хетерополизахарид, съдържащ главно глюкоза. От екстракционен остатък на *D. salina*, Dai et al. (2010) получават суров полизахариден екстракт (PD), съдържащ четири фракции - PD1, PD2, PD3, PD4 и две субфракции PD4a и PD4b. Резултатите от анализа на монозахаридите показват, че PD1 и PD4a са кисели хетерополизахариди, съдържащи съответно глюкоза и галактоза, а PD4a съдържа сулфатирани групи. PD2 и PD3 са глюкани, докато PD4b е комплекс от полизахарид, свързан с нуклеинови киселини чрез ковалентни връзки. Съставът на PD4a (Mw = 424.2 kDa) подкрепя твърдението на Fabregas et al. (1999), че водните екстракти от *D. salina* показващи антивирусна активност съдържат сулфатирани полизахариди с високо молекулно тегло.

IV.3. Биологична активност на продукти, получени от *Coelastrella* sp. BGV

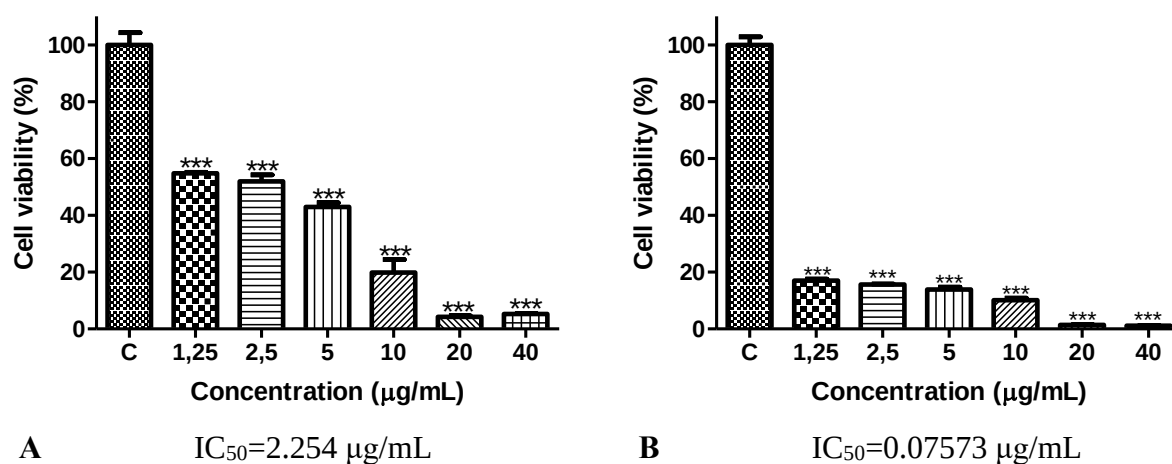
От културална течност на *Coelastrella* sp. BGV са изолирани екзополisahарид и извънклетъчни отделения (лиофилно изсушена културална течност), а от водорасловата биомаса са приготвени водни екстракти (нискотемпературен и високотемпературен), алкохолен екстракт, маслен екстракт, мастни киселини и неосапуняеми вещества. Антитуморната, антибактериална и антигъбна активности на тези водораслови продукти са изследвани в опити *in vitro*.

IV.3.1. Антитуморна активност

IV.3.1.1. Антипролиферативен ефект на водораслови продукти от *Coelastrella* sp. BGV.

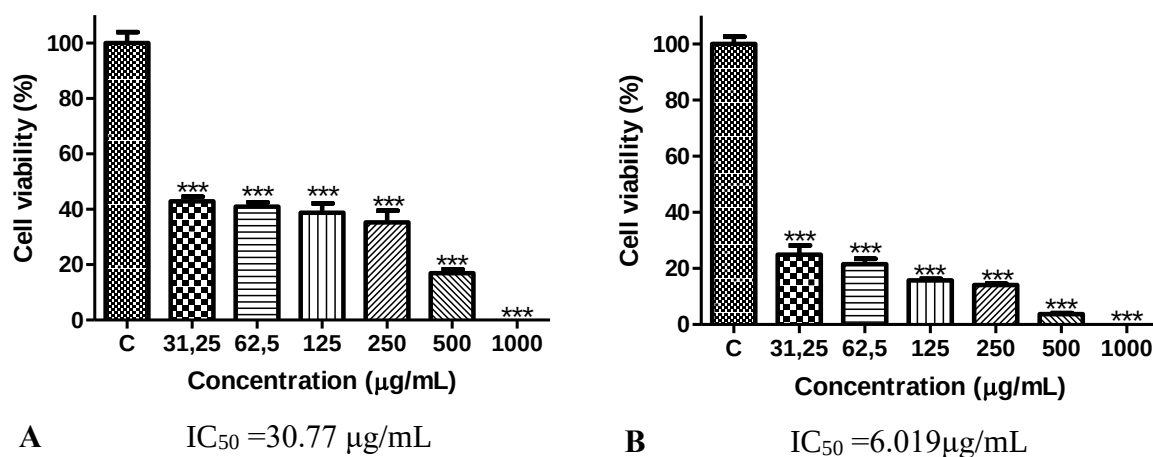
Антитуморната активност на изследваните водораслови продукти е проучена спрямо човешка туморна клетъчна линия HeLa чрез прилагане на МТТ тест след третиране на туморните клетки за 24 и 48 часа. При всички експерименти, HeLa клетки, култивирани само в среда DMEM с 10% FBS са използвани за негативна контрола (C), при която стойността на клетъчната жизнестойност е приета за 100%. Изчислена е концентрацията, при която се постига 50% инхибиране на растежа на туморните клетки (IC₅₀).

Като положителна контрола е използван антитуморният антибиотик Doxorubicin (Dox), широко прилаган в клиничната практика за лечение на злокачествени заболявания при човека. HeLa туморни клетки са култивирани за 24 и 48 часа в присъствие на Dox в концентрации от 40 до 1.25 $\mu\text{g/mL}$. Антибиотикът снижава статистически значимо клетъчната жизненост/пролиферация, като стойностите са между 5 и 54% на 24-ти час и между 1 и 17% на 48-ми час от третирането. Наблюдаваният ефект е концентрационно- и време-зависим. Отчетени са $\text{IC}_{50}=2.254 \mu\text{g/mL}$ на 24-ти час и $\text{IC}_{50}=0.07573 \mu\text{g/mL}$ на 48-ми час (Фиг. 9А, В).



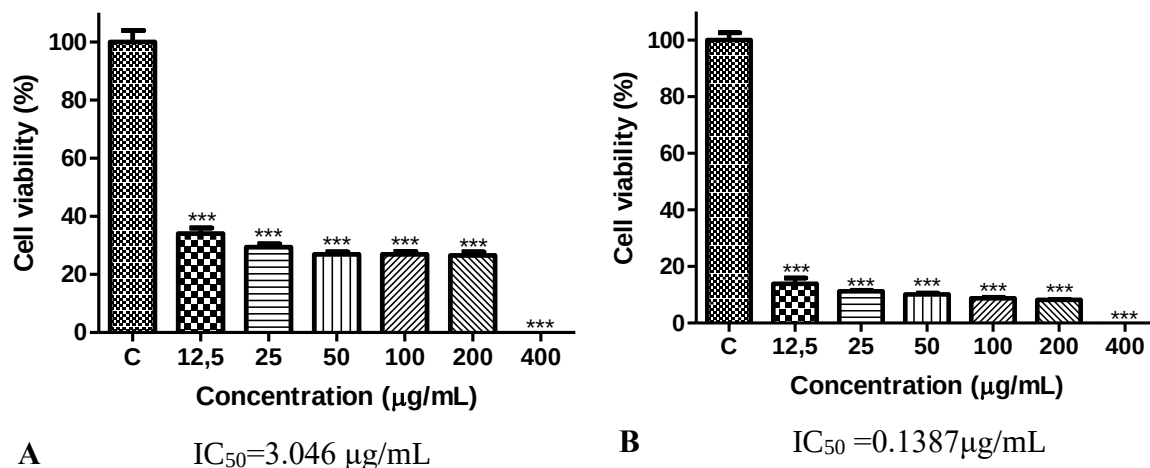
Фигура 9. Ефект на Doxorubicin върху пролиферацията на HeLa туморни клетки, отчетен на 24-ти час (А) и 48-ми час (В) с МТТ тест. ***($p<0.001$)

Алкохолният екстракт (АЕ) от *Coelastrella* sp. BGV е изследван в двукратно падащи концентрации - от 1000 до 31.25 $\mu\text{g/mL}$. Още на 24-ти час, при всички изследвани концентрации се наблюдава статистически значимо понижаване на клетъчната жизненост ($p<0.001$) в сравнение с контролата - нетретираните туморни клетки (C) и отчетените стойности са между 0 и $42.9 \pm 3.3\%$ (Фиг. 10А). На 48-ми час от третирането отчетените стойности са по-ниски и са между 0 и $24.9 \pm 6.5\%$ (Фиг. 10В). Изчислените IC_{50} концентрации са 30.77 $\mu\text{g/mL}$ на 24-ти час и 6.019 $\mu\text{g/mL}$ на 48-ми час от третирането.



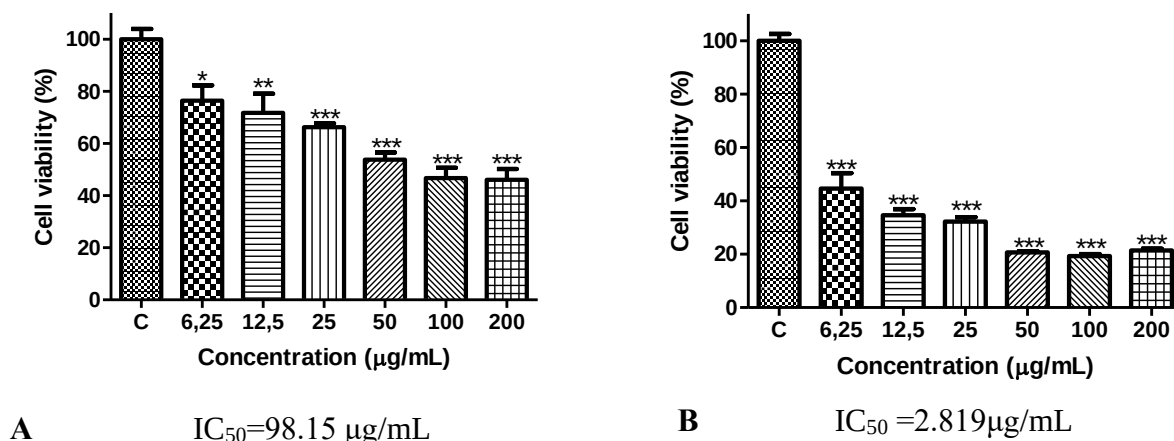
Фигура 10. Ефект на алкохолен екстракт (АЕ) от *Coelastrella* sp. BGV, върху пролиферацията на HeLa туморни клетки, отчетен на 24-ти час (А) и 48-ми час (В) с МТТ тест. ***($p<0.001$)

Мастните киселини (МК) са изследвани в концентрации от 400 до 12.5 $\mu\text{g/mL}$. При всички изследвани концентрации се наблюдава статистически значимо инхибиране на клетъчната пролиферация, като процентът на инхибиция е по-изразен на 48-ми час. Стойностите варират между 100 и $65.98 \pm 3.993\%$ на 24-ти час и между 100 и $86.09 \pm 3.9\%$ на 48-ми час. (Фиг. 11А, В). $\text{IC}_{50} = 3.046 \mu\text{g/mL}$ и $\text{IC}_{50} = 0.1387 \mu\text{g/mL}$ са изчислени на 24-ти и 48-ми час, съответно.



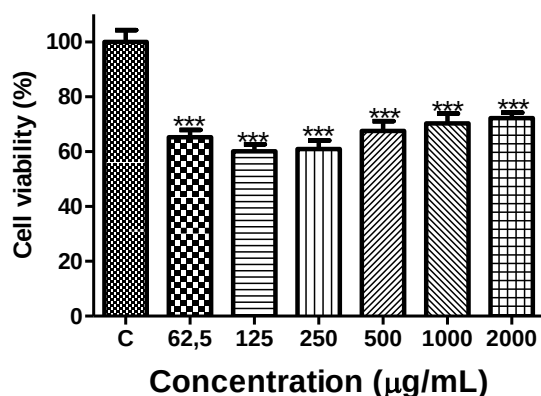
Фигура 11. Ефект на мастни киселини (МК) от *Coelastrella* sp. BGV върху пролиферацията на HeLa туморни клетки, отчетен на 24-ти час (А) и 48-ми час (В) с МТТ тест. ***($p < 0.001$)

Неосапуняемите вещества (НВ) са приложени в концентрации от 200 до 6.25 $\mu\text{g/mL}$. Наблюдава се концентрационно зависима инхибиция на пролиферацията на HeLa туморни клетки на 24-ти час в границите между $53.91 \pm 7.077\%$ и $23.56 \pm 11.72\%$ (Фиг. 12А), която се засилва на 48-ми час и достига $78.64 \pm 1.340\%$ и $55.41 \pm 8.181\%$ за най-високата и най-ниската концентрации съответно (Фиг. 12В). Изчислените IC_{50} са $98.15 \mu\text{g/mL}$ и $2.819 \mu\text{g/mL}$ за 24-ти час и 48-ми час от третирането.

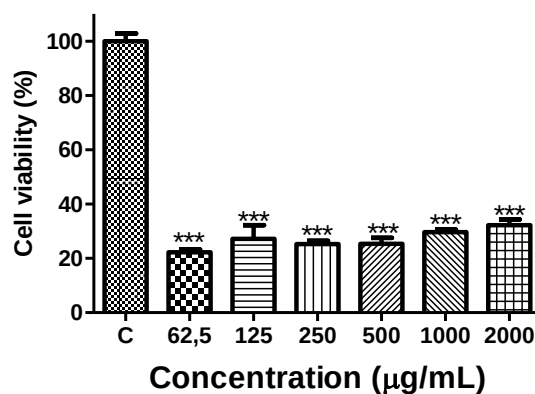


Фигура 12. Ефект на неосапуняеми вещества (НВ) от *Coelastrella* sp. BGV, върху пролиферацията на HeLa туморни клетки, отчетен на 24-ти час (А) и 48-ми час (В) с МТТ тест. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ***($p < 0.001$)

Извънклетъчните отделения (КС), приложени в 6 различни концентрации (от 2000 до 62.5 $\mu\text{g/mL}$), статистически значимо потискат клетъчната пролиферация на HeLa ($p < 0.001$) до стойности 60-72% на 24-ти час (Фиг. 13А), и до около 2.5 пъти по-ниски стойности (22-32%) на 48-ми час (Фиг. 13В). Ефектът е време-зависим.



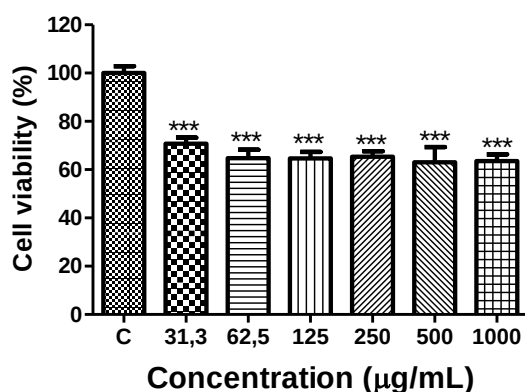
A



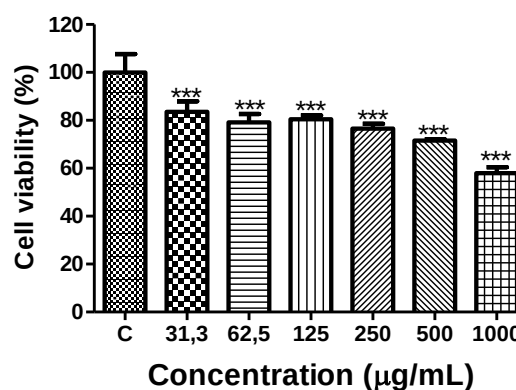
B

Фигура 13. Ефект на извънклетъчни отделения в културалната среда (КС) от *Coelastrella* sp. BGV, върху пролиферацията на HeLa туморни клетки, отчетен на 24-ти час (A) и 48-ми час (B) с MTT тест. ***($p < 0.001$)

Третирането на HeLa туморни клетки с нискотемпературен воден екстракт (НТ) статистически значимо понижава клетъчната жизненост и през двата времеви интервала на изследване (Фиг. 14A, B). Отчетените стойности на 24-ти час са по-ниски от тези на 48-ми час за всяка от приложените 6 концентрации (от 1000 до 31.3 µg/mL), с изключение на най-високата. Най-ниска жизненост на HeLa клетките се наблюдава при концентрация на НТ от 1000 µg/mL - $63.6 \pm 2.8\%$ и $58 \pm 2.4\%$ на 24-ти и 48-ми час, съответно.



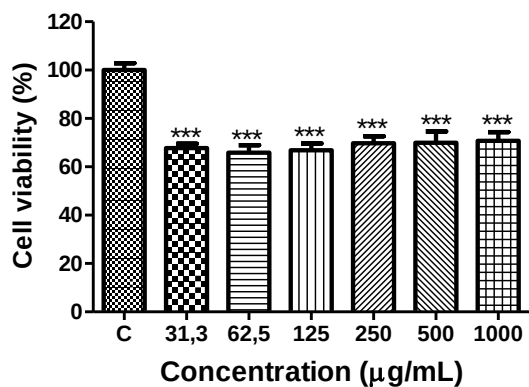
A



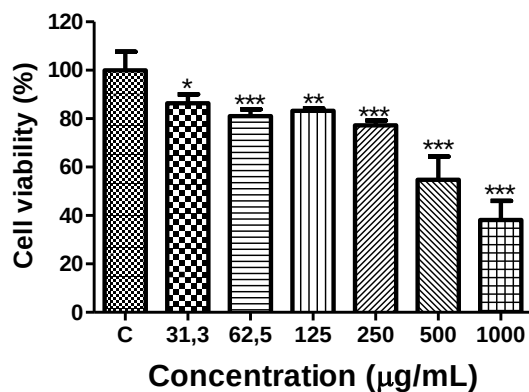
B

Фигура 14. Ефект на нискотемпературен воден екстракт (НТ) от *Coelastrella* sp. BGV, върху пролиферацията на HeLa туморни клетки, отчетен на 24-ти час (A) и 48-ми час (B) с MTT тест. ***($p < 0.001$)

Високотемпературният воден екстракт (ВТ) е изследван в концентрации от 1000 до 31.3 µg/mL. При всички концентрации се наблюдава статистически значим антипролиферативен ефект. На 24-ти час от третирането жизнеността на HeLa клетките варира между 65.8 и 70.7% (Фиг. 15A). На 48-мия час, при ниските концентрации процентът на жизнени клетки е сравнително висок. Концентрации над 250 µg/mL водят до понижаване на клетъчната пролиферация до $54.7 \pm 9.6\%$ и $38.1 \pm 8.0\%$ при 500 и 1000 µg/mL, съответно (Фиг. 15 B). IC_{50} на 48-ми час е 486.9 µg/mL.



A

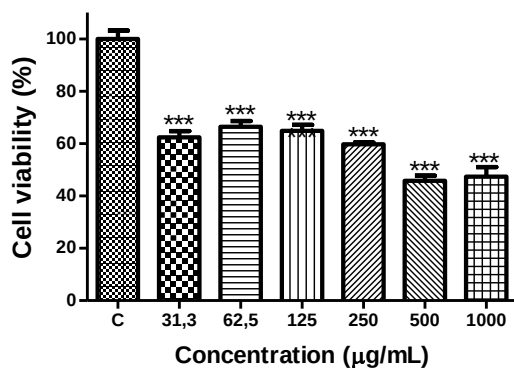


B

IC₅₀=486.9µg/mL

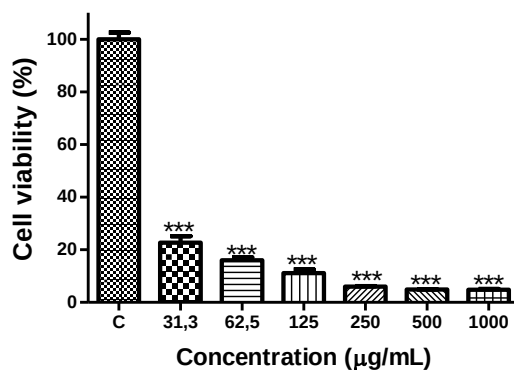
Фигура 15. Ефект на високотемпературен воден екстракт (BT) *Coelastrella* sp. BGV, върху пролиферацията на HeLa туморни клетки, отчетен на 24-ти час (A) и 48-ми час (B) с МТТ тест. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ***($p < 0.001$)

Жизнеспособността на HeLa туморни клетки, култивирани в присъствие на екзополisahарид (ЕПЗХ) от *Coelastrella* sp. BGV, отчетена на 24-ти час е между $62.3 \pm 4.8\%$ и $45.8 \pm 3.9\%$ от тази на нетретираните туморни клетки (Фиг. 16A). На 48-ми час стойностите са 3 до 10 пъти по-ниски от тези на 24-ти час и са както следва: $22.7 \pm 4.3\%$, $16.0 \pm 2.2\%$, $11.1 \pm 2.7\%$, $6.0 \pm 0.24\%$, $4.9 \pm 0.22\%$ и $4.8 \pm 0.44\%$, при концентрации на ЕПЗХ от 31.3, 62.5, 125, 250, 500, и 1000 µg/mL, съответно (Фиг. 16B). При най-високите концентрации от 500 µg/mL и 1000 µg/mL жизнеността на туморните клетки е най-ниска. Наблюдаваният инхибиращ ефект на ЕПЗХ е време- и концентрационно зависим на 48 час от третирането. Отчетени са IC₅₀ = 643.110 µg/mL на 24-ти час и IC₅₀ = 4.310 µg/mL на 48-ми час.



A

IC₅₀=643.110 µg/mL

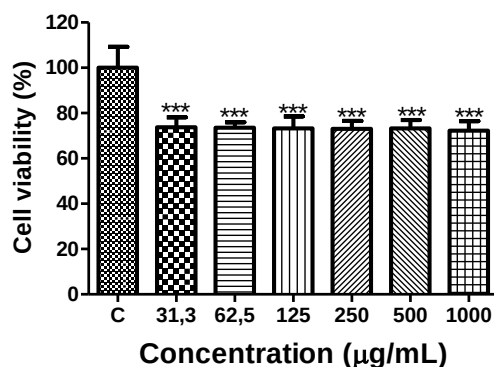


B

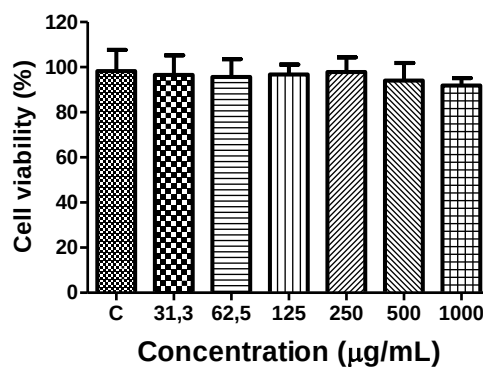
IC₅₀=4.310 µg/mL

Фигура 16. Ефект на екзополisahарид (ЕПЗХ) от *Coelastrella* sp. BGV върху пролиферацията на HeLa туморни клетки, отчетен на 24-тия час (A) и 48-мия час (B) с МТТ тест. ***($p < 0.001$)

Масленият екстракт от зеленото микроводорасло *Coelastrella* sp. BGV понижава статистически значимо пролиферацията на HeLa туморни клетки само на 24-ти час от изследването, като при всички приложени концентрации стойностите за клетъчна жизненост са 72-73% (Фиг. 17A).



A



B

Фигура 17. Ефект на маслен екстракт (МЕ) от *Coelastrella* sp. BGV, върху пролиферацията на HeLa туморни клетки, отчетен на 24-ти час (A) и 48-ми час (B) с МТТ тест. ***($p < 0.001$)

В Таблица 4 са обобщени IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) стойностите на продукти от *Coelastrella* sp. BGV спрямо HeLa туморни клетки. Най-висока антитуморна активност при 24-часово въздействие проявяват МК, следвани от АЕ, НВ и ЕПЗХ. При 48-часово въздействие отново най-силен е ефекта на МК, последвани от НВ, ЕПЗХ, АЕ, КС и ВТ.

Таблица 4. IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) на продукти от *Coelastrella* sp. BGV

Водораслов продукт	IC_{50} 24-ти час	IC_{50} 48-ми час
АЕ	30.77	6.019
МК	3.046	0.1387
НВ	98.15	2.819
КС	-	<62.5
НТ	-	-
ВТ	-	486.9
ЕПЗХ	643.110	4.310
МЕ	-	-
Dox	2.254	0.07573

Анализът на получените резултати показва, че HeLa туморни клетки са чувствителни към водорасловите продукти, изолирани от *Coelastrella* sp. BGV. Изследваните извлекци и метаболити от българския щам статистически достоверно понижават жизнеността на туморните клетки в опити *in vitro*, отчетена с МТТ тест след третиране за 24 и 48 часа. За АЕ и НВ е установен дозо- и време-зависим ефект, а ефектът на МК, КС и ЕПЗХ е време-зависим. С удължаване на времето на третиране на 48 часа, отчетените IC_{50} стойности са в пъти по-ниски от тези на 24-ти час. За ЕПЗХ например, намаляването на IC_{50} е 150 пъти, а за МК е 22 пъти. При 48-часово третиране, ЕПЗХ проявява и дозо-зависимо антипролиферативно действие. Най-висока цитотоксичност спрямо HeLa туморни клетки на 24-ти час е отчетена за МК, последвани от АЕ, НВ и ЕПЗХ. На 48-ми час отново най-висок ефект проявяват МК, следвани от НВ, ЕПЗХ, АЕ, КС и ВТ. Прави впечатление, че масните киселини (МК) изолирани от *Coelastrella* sp. BGV проявяват на 24-ти час антипролиферативен ефект със стойност на IC_{50} близка до тази за класическия цитостатик Doxorubicin. Подобен, съизмерим на цитостатика ефект е отчетен за НВ на 48-ми час от третирането. Високата

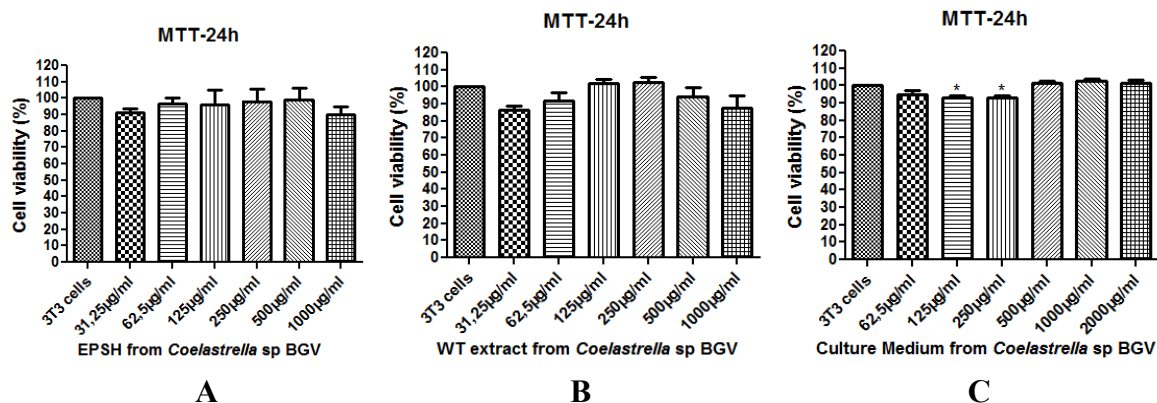
активност на МК на *Coelastrella* sp. BGV може да се дължи на влизащите в състава им палмитинова, олеинова, линолова и γ -линоленова мастни киселини, за които по-рано е установено, че инхибират растежа на туморни клетки (Bergé et al., 2002; Ramesh and Das, 1998).

Изследваните НТ (нискотемпературен) и ВТ (високотемпературен) водни екстракти, и маслен екстракт (МЕ) от биомаса на *Coelastrella* sp. BGV статистически достоверно понижават жизнеността на HeLa туморни клетки за двата времеви интервала (24-ти и 48-ми час), с изключение на МЕ, който на 48-ми час няма ефект. При 24-часа въздействие, трите извлека, приложени в едни и същи концентрации, имат сходен антипролиферативен ефект. При 48-часа въздействие, обаче, високите концентрации (500 и 1000 $\mu\text{g/mL}$) на ВТ воден екстракт значително по-силно потискат пролиферацията на HeLa клетките в сравнение със същите концентрации на НТ воден екстракт.

Гъчева (2012) и Gigova et al. (2011) изследват етанолни (липофилни) и водни клетъчни извлекци и културална течност от зелени микроводорасли за цитотоксичност срещу HeLa туморни клетки. Културалната течност от *Coelastrella* sp., *Scenedesmus incrassatulus* и 3B1, и водни извлекци от *Chlorella* sp., *Scenedesmus obliquus*, 3B1 и *Coelastrella* sp. потискат пролиферацията на HeLa клетки, като ефектът на водните извлекци е концентрационно зависим. В сравнение с културалните течности, водните екстракти показват по-силно цитотоксично действие. Липофилен екстракт от *Scenedesmus incrassatulus* проявява ниска активност, докато от всички изследвани, липофилните вещества от *Chlorella* sp. са най-токсични за HeLa (80% потискане на растежа на клетките) дори и при най-ниските приложени концентрации (100 $\mu\text{g/mL}$). Мастни киселини от *Scenedesmus incrassatulus* и *Scenedesmus obliquus* показват висока активност, но най-висока активност авторите установяват за мастните киселини от *Coelastrella* sp. и *Chlorella* sp. с IC_{50} на 24-ти час по-ниска от 15 $\mu\text{g/mL}$ (Гъчева, 2012; Gigova et al., 2011). Silambarasan et al. (2014) установяват висока цитотоксична активност срещу HeLa (с IC_{50} от 50 $\mu\text{g/mL}$) на метанолен екстракт от *Scenedesmus obliquus* RDS01. Диетилетерен екстракт от *Scenedesmus obliquus* инхибира пролиферацията на 3 човешки туморни клетъчни линии - HepG2 (човешки хепатоцелуларен карцином), HCT116 (рак на дебелото черво) и MCF-7 (аденокарцином на млечна жлеза) с IC_{50} концентрации 24.6 $\mu\text{g/mL}$ за HepG2, 42.77 $\mu\text{g/mL}$ за HCT116 и 93.8 $\mu\text{g/mL}$ за MCF-7 (Marrez et al., 2019). Липиди от *Scenedesmus obliquus*, екстрахирани с хлороформ:метанол (2:1 v/v), показва висока антитуморна активност срещу MCF7, HepG2 и HCT116 със стойности на IC_{50} от 11.62, 14.5 и 15.22 $\mu\text{g/mL}$, съответно (Abd El Baky et al., 2014). В изследване проведено от Iyer et al. (2015), екстракт от *Coelastrella oocystiformis*, съдържащ главно каротеноиди и приложен в концентрации от 40 и 80 $\mu\text{g/mL}$, инхибира растежа на само 5% от DU-145 ракови клетки (човешка клетъчна линия от рак на простатата). От двете нискомолекулни полизахаридни фракции, изолирани от *Chlorella pyrenoidosa*, фракция I съдържаща основно галактоза е с по-висока активност срещу A549 човешки туморни клетки (от рак на белия дроб) от втората ПЗХ фракция, съдържащата основно рамноза. Приложени в концентрация 1000 $\mu\text{g/mL}$, след 48 часа фракция I инхибира 68.7% от туморните клетки, а фракция II - 49.5% (Sheng et al., 2007). В сравнение с фракция I на полизахарида от *Chlorella pyrenoidosa*, ЕПЗХ от *Coelastrella* sp. BGV, които също съдържа основно галактоза, показва по-висока антитуморна активност (с IC_{50} от 4.310 $\mu\text{g/mL}$). Разликата в антитуморната ефективност може да се дължи на различните молекулни тегла, монозахарен състав, конформация на веригите, заряд на различните полизахариди (Sheng et al., 2007; Zhang et al., 2007), както и на тестираните туморни клетъчни линии.

Антипролиферативна активност на ЕПЗХ, ВТ и КС спрямо нормални миши фибробласти (3Т3)

Проучен е ефектът на ЕПЗХ, високотемпературен воден екстракт (ВТ) и културална среда (КС) от *Coelastrella* sp. BGV върху жизнеността/пролиферацията на 3Т3 миши фибробласти, широко използвани за контрола в експерименталната практика като нормална клетъчна линия.



Фигура 18. Ефект на ЕПЗХ (А), ВТ (В) и КС (С) получени от зеленото микроводорасло *Coelastrella* sp. BGV върху жизнеността/пролиферацията на 3Т3 миши фибробласти, отчетен на 24-ти час с МТТ тест.

Резултатите от МТТ теста показват статистически незначимо понижаване на жизнеността на 3Т3 миши фибробласти на 24-ти час след третиране с водорасловите проби. ЕПЗХ, приложен в концентрации както при HeLa клетки, намалява процентът на жизненост на 3Т3 фибробластите в границите от $98.11 \pm 15.03\%$ до $89.84 \pm 10.36\%$. При ВТ спадът в жизнеността на нормалните 3Т3 клетки е до 13% и достига $86.38 \pm 5.0\%$, а при КС - е около 8% и достига $92.86 \pm 2.74\%$. (Фиг. 18А, В, С).

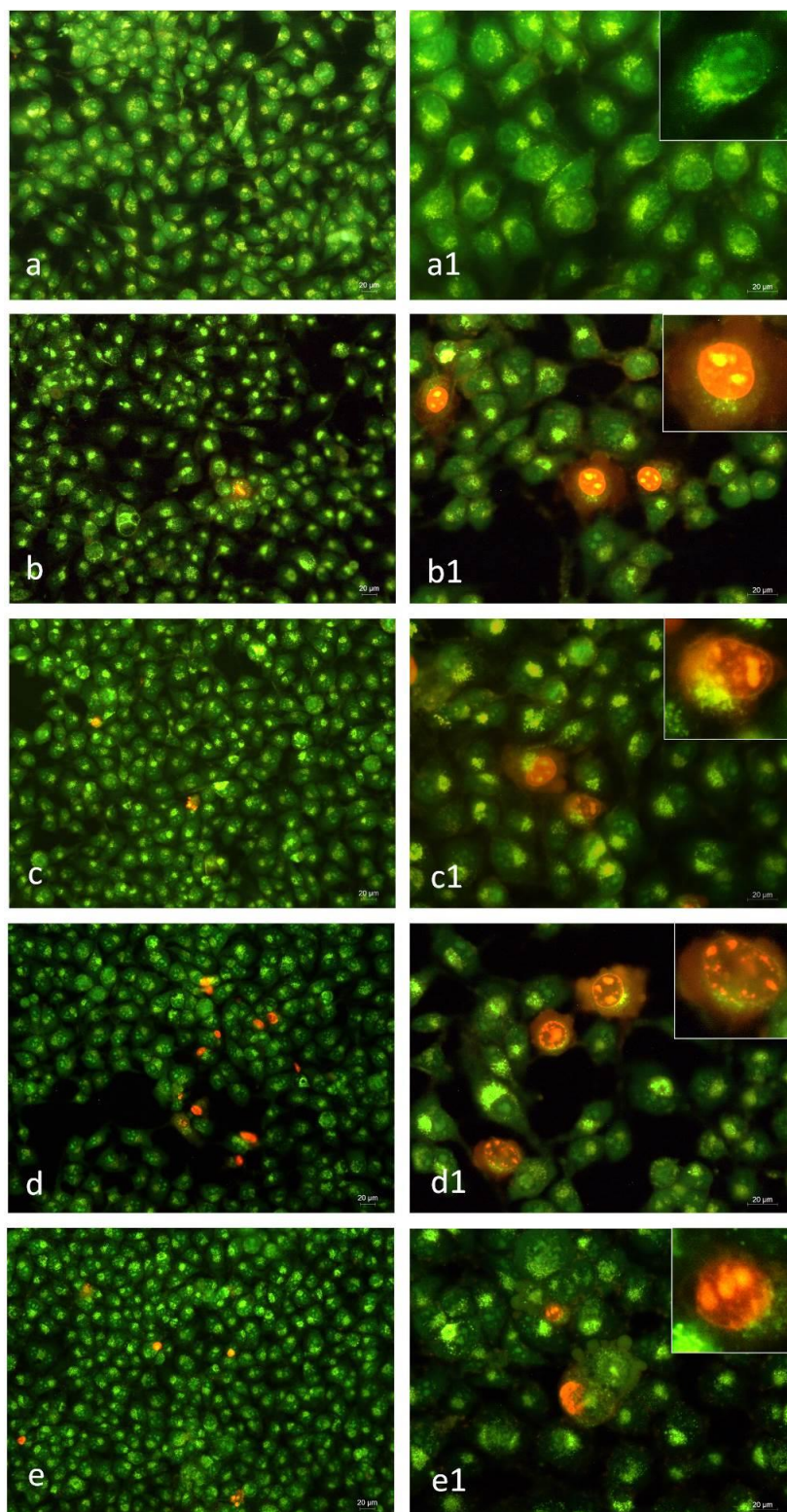
Получените резултати дават основание да предположим специфична активност на водорасловите продукти спрямо HeLa човешки туморни клетки.

IV.3.1.2. Цитоморфологични проучвания на HeLa туморни клетки, култивирани в присъствие на водораслови продукти получени от *Coelastrella* sp. BGV, чрез флуоресцентни методи

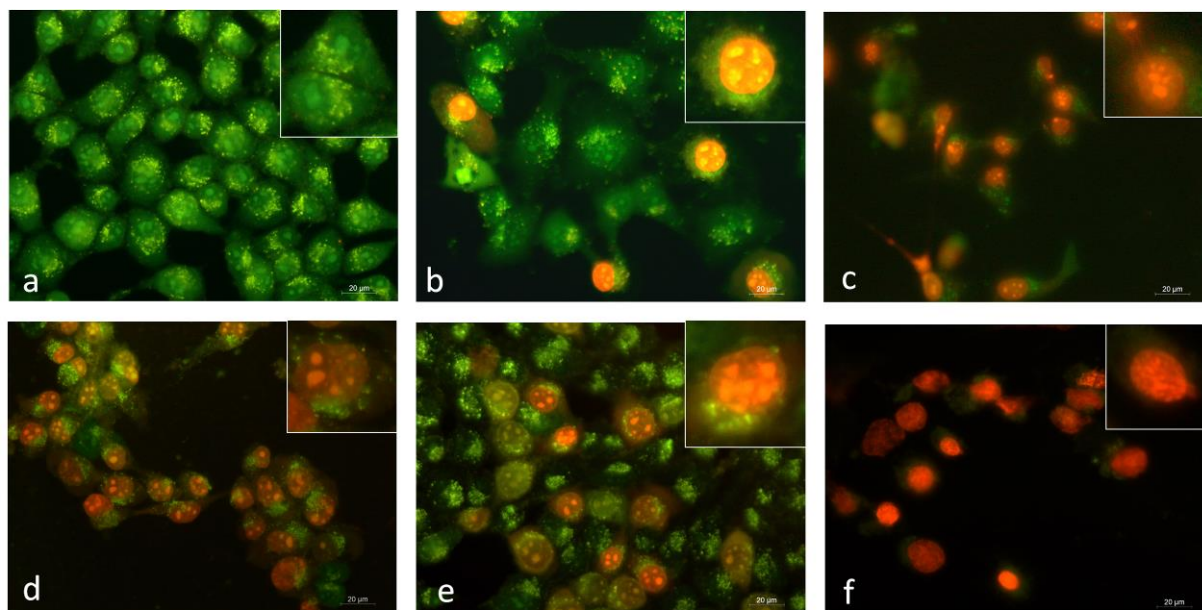
Целта на тези изследвания бе да се установи типа клетъчна смърт (апоптоза или некроза) в третираните туморни клетки по морфологичните изменения на ниво клетка и ядро след двойно оцветяване с флуорохроми - АО/EtBr и на ниво ядро след оцветяване с DAPI. HeLa туморните клетки, са култивирани в присъствие на водорасловите продукти, приложени в концентрации, равни на IC_{50} за съответния продукт, отчетена на 24-ти час (Табл. 4, МК - $3 \mu\text{g/mL}$; АЕ - $30 \mu\text{g/mL}$; НВ - $100 \mu\text{g/mL}$; ЕПЗХ - $600 \mu\text{g/mL}$), или в максималната начална доза (НТ - $1000 \mu\text{g/mL}$; ВТ - $1000 \mu\text{g/mL}$; МЕ - $1000 \mu\text{g/mL}$; КС - $1000 \mu\text{g/mL}$).

IV.3.1.2.1. Цитоморфологични промени на HeLa туморни клетки, култивирани в присъствие на водораслови продукти от *Coelastrella* sp. BGV, оценени след интравитално оцветяване с акридин оранж (АО) и етидиев бромид (EtBr).

АО оцветява живите и неживи клетки, излъчвайки силна зелена флуоресценция, като резултат от интеркалирането му в двойноверижната ДНК, както и червено-оранжева флуоресценция при свързването му с едноверижни РНК. За разлика от АО, EtBr е флуорохром, който не оцветява живи клетки и такива с интактна мембрана (ранно апоптотични). Той оцветява мъртви и късно апоптотични клетки, които са с повишена мембранна пропускливост.



Фигура 19. Флуоресцентна микроскопия на HeLa туморни клетки, култивирани в присъствие на водораслови продукти от *Coelastrella* sp. BGV. а, а1 - в хранителна среда (контрола); b, b1 - алкохолен екстракт (АЕ); с, с1 - мастни киселини (МК); d, d1 - неосапуняеми вещества (НВ); е, е1 - културална среда (КС); 200× (а-е) и 400× (а1-е1); bar 20 µm; *оцветяване AO/EtBr.*



Фигура 20. Флуоресцентна микроскопия на HeLa туморни клетки, култивирани в присъствие на водораслови продукти получени от *Coelastrella* sp. BGV. а - в хранителна среда (негативна контрола); b - ниско температурен воден екстракт (НТ); с - в високо температурен воден екстракт (ВТ); d - екзополisahарид (ЕП3Х); е - маслен екстракт (МЕ); f - Doxorubicin (10 µg/mL) (позитивна контрола); 400×; bar 20 µm; **оцветяване AO/EtBr.**

HeLa туморни клетки, третирани с НТ, ВТ и МЕ (1000 µg/mL) и ЕП3Х (600 µg/mL) от *Coelastrella* sp. BGV за 24 часа показват типични морфологични характеристики на ранно- и късноапоптотични клетки, като преобладават клетките с късноапоптотични изменения – наситено оранжево-червено оцветено ядро с кондензация на хроматина (Фиг. 20).

HeLa туморни клетки, култивирани в присъствие на НТ (Фиг. 20b): преобладават клетките в стадии на ранна апоптоза, зеленооцветени клетки със зеленооцветено ядро, но с преразпределение на ядрения хроматин (кондензация). Прави впечатление заличаването на клетъчния контур и ядрената мембрана, както и появата на дребни червено оцветени гранули в цитоплазмата.

HeLa туморни клетки, култивирани в присъствие на ВТ (Фиг. 20c): силно нарушен монослоен растеж. Силно редуциран (намален) клетъчен брой. Силно променени клетки с морфология, подобна на тази при позитивната контрола с Doxorubicin. Виждат се единични оранжево-червени голи ядра с кондензация на хроматина и сенки от цитоплазма. Наблюдават се редукция на клетъчния и ядрен обем (picnosis) и фрагментация на ядрото (karyorrhexis).

HeLa туморни клетки, култивирани в присъствие на ЕП3Х (Фиг. 20d): наблюдава се нарушен монослоен растеж, намален клетъчен обем, наличие на клетки в късен стадии на апоптоза (наситено оранжево-червено оцветено ядро с кондензация на хроматина и фрагментация).

HeLa туморни клетки, култивирани в присъствие на МЕ (Фиг. 20e): морфологичната картина е на клетки в стадии на късна апоптоза - ядра от оранжево кафяви до наситено оранжево-червени на цвят с кондензация, маргинация на хроматина и фрагментация.

HeLa туморни клетки, култивирани в присъствие на Dox (Фиг. 20f): силна редукция на броя на клетките, виждат се единични ярки с червенооранжев цвят оголени

ядра и сенки от цитоплазма. Ядрата са полиморфни по размер (с различна големина), с кондензация на хроматина и фрагментация на ядрото.

Получените резултати показват наличието на клетки с нарушена морфология, което отговаря на клетки с понижена жизнеспособност и оттам с понижена до липсваща функционална активност. Данните за цитоморфологични промени са в подкрепа на резултатите получени от МТТ теста.

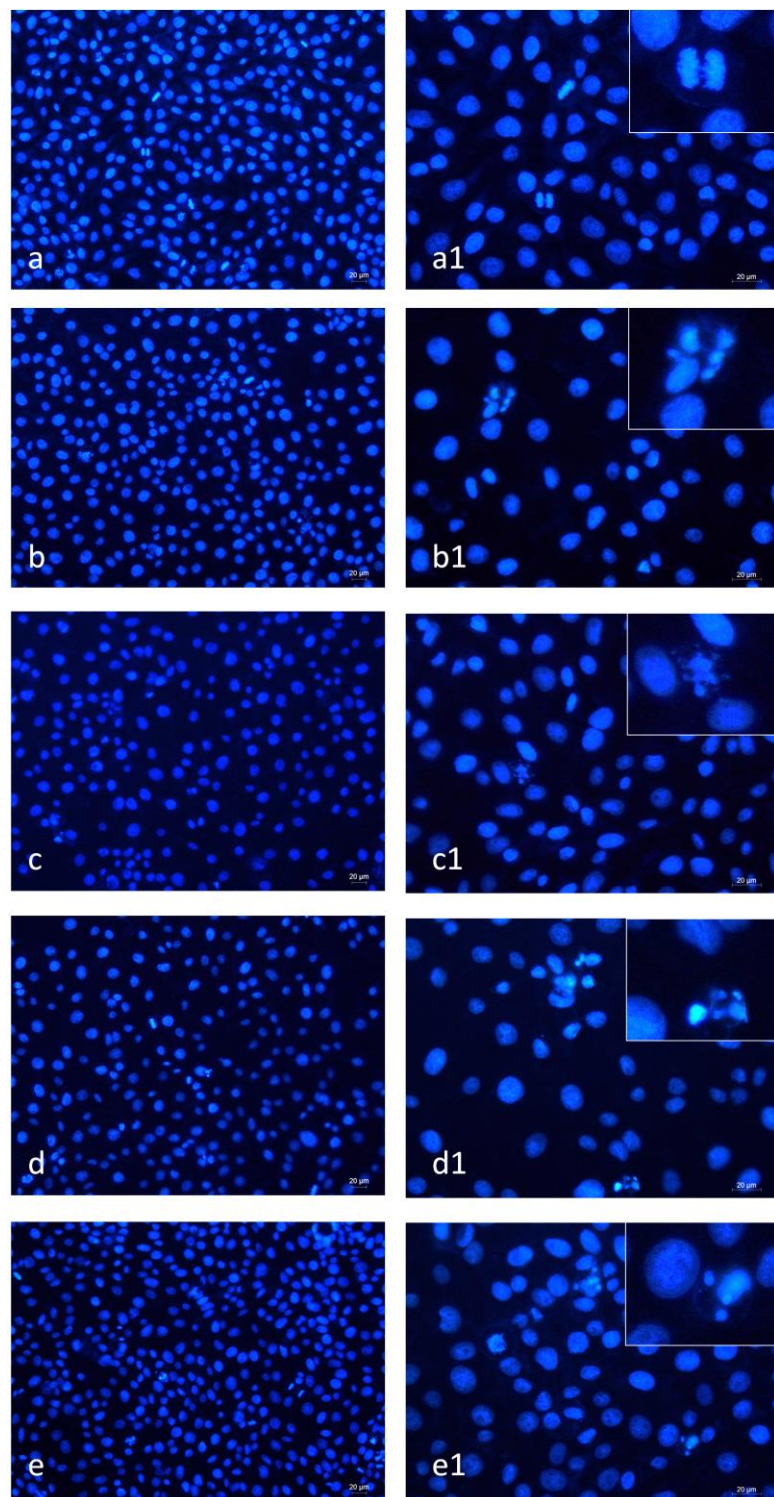
IV.3.1.2.2. Оценка на ядрената морфология на HeLa туморни клетки, третирани с водораслови продукти от *Coelastrella* sp. BGV - оцветяване с DAPI

Цел на проведените изследвания е чрез доказване на промени в клетъчното ядро да получим информация за клетъчна смърт по пътя на индукция на апоптоза. Молекулата на DAPI може да преминава през интактна цитоплазмена мембрана, което го прави подходящ агент за изучаване на ядрената морфология както на живи, така и на фиксирани клетки.

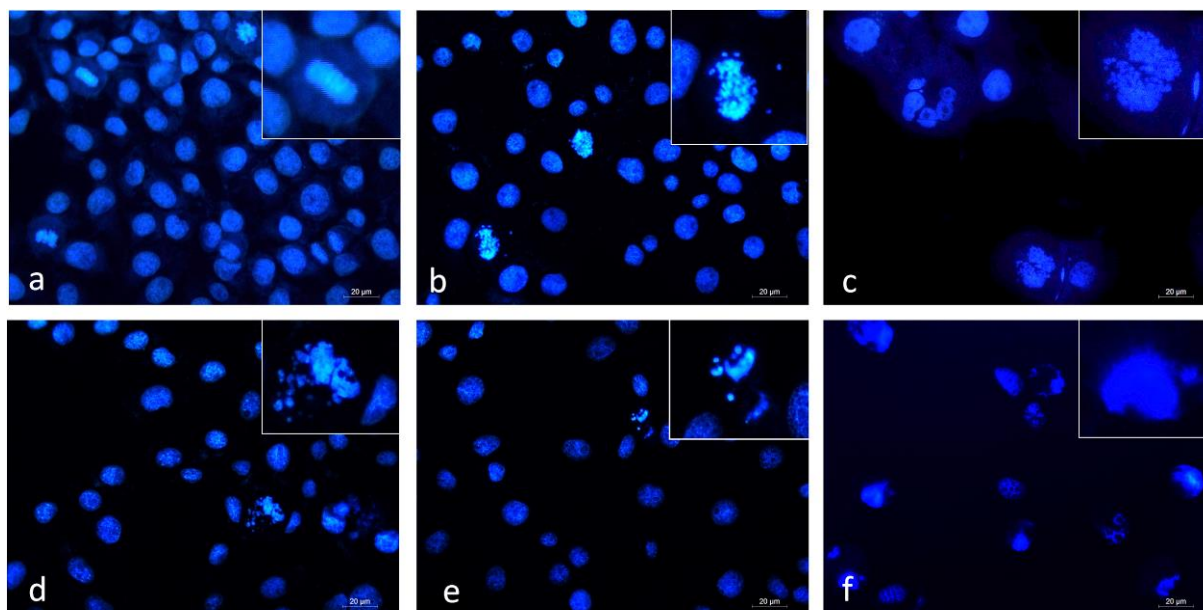
Контролата, нетретирани HeLa туморни клетки (Фиг. 21 а, а1) са с интактни ядра, кръгли до леко овални по форма и почти еднакви по големина, с гладки очертания и равномерно разпределен хроматин. Наблюдават се ядра на клетки в различни фази на митоза (делене).

HeLa туморни клетки, култивирани в присъствие на АЕ, МК, НВ и КС показват сходна по атипизъм ядрена морфология - ядрен полиморфизъм (различни по форма и големина ядра), неравни очертания на ядрата, неравномерно разпределен (изразени маргинация и кондензация на хроматина) хроматин, фрагментация на ядрото и апоптотични телца (Фиг. 21 b, b1; c, c1; d, d1; e, e1).

Морфологичните изменения в ядрата на туморните клетки HeLa, третирани за 24 часа с НТ, ВТ, ЕПЗХ и МЕ от *Coelastrella* sp. BGV, и онагледени чрез оцветяване с DAPI са представени на Фигура 22. Нетретирани контролни HeLa клетки са с ядрена морфология описана при предходната фигура (Фиг. 21 а). За разлика от контролните, при третираните с НТ, ВТ, ЕПЗХ и МЕ клетки се наблюдават значителни морфологични изменения в ядрата, типични за апоптоза: ядрен полиморфизъм, силно нарушен хроматинов рисунък (кондензация на хроматина, маргинация на хроматина, фрагментация на ядрото и формиране на апоптотични телца (Фиг. 22 b, c, d, e). Като позитивна контрола в опитите са използвани HeLa туморни клетки, третирани с антрациклиновия антитуморен антибиотик Doxorubicin (Фиг. 22 f). При третираните с Doxorubicin HeLa клетки се наблюдава силно редуциран брой ядра, ядра с неравни очертания, кондензиран хроматин и ядра в разпад с множество апоптотични телца. Правят впечатление по-малкият брой на ядрата в препаратите, третирани с водораслови метаболити в сравнение с нетретираната контрола и сходната морфологична картина на препаратите третирани с ВТ и Doxorubicin (Фиг. 22 c, f).



Фигура 21. Морфологични промени в ядрата на HeLa туморни клетки, култивирани 24 часа в присъствие на водораслови продукти от *Coelastrella* sp. BGV. a, a1 - в хранителна среда (негативна контрола); b, b1 - етанолен екстракт (АЕ); c, c1 - мастни киселини (МК); d, d1 - неосапуняеми вещества (НВ); e, e1 - лиофилно изсушена културална среда (КС); 200× (a-e) и 400× (a1-e1); bar 20 µm; *оцветяване с DAPI*.



Фигура 22. Морфологични промени в ядрата на HeLa туморни клетки, култивирани 24 часа в присъствие на водораслови продукти получени от *Coelastrella* sp. BGV. а - в хранителна среда (негативна контрола); b - ниско температурен воден екстракт (НТ); с - високо температурен воден екстракт (ВТ); d - екзополизахарид (ЕПЗХ); е - маслен екстракт (МЕ); f - Doxorubicin (10 µg/mL) (позитивна контрола); 400×; bar 20 µm; оцветяване с **DAPI**.

Резултатите, получени чрез прилагане на МТТ тест и флуоресцентни методи на изследване показват, че изследваните продукти от *Coelastrella* sp. BGV значително понижават процента на жизнени HeLa туморни клетки, което е свързано с индуциране на програмирана клетъчна смърт.

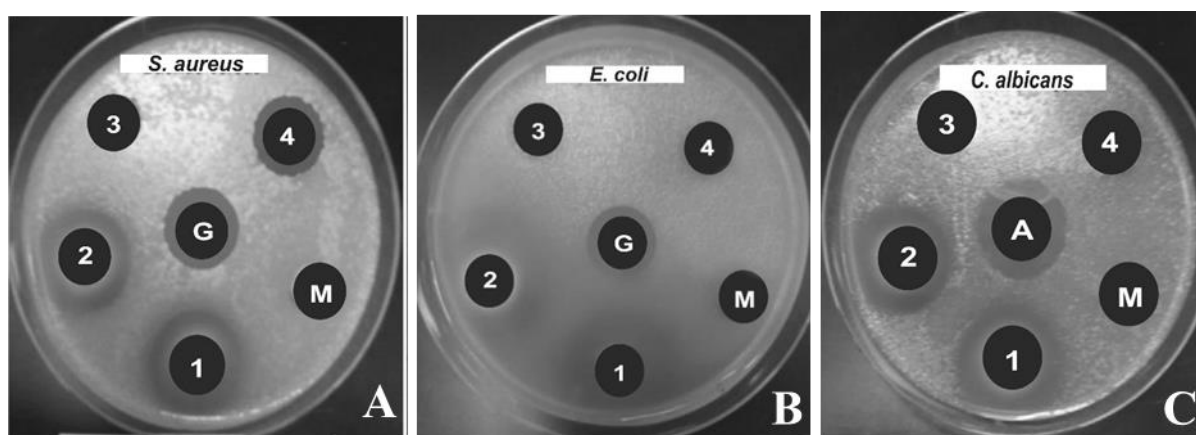
По литературни данни, антитуморното действие на редица агенти с микроводораслов произход (каротеноиди, сулфатирани полизахариди, фенолни производни, стероли, липопептиди, депсипептиди, поликетиди, алкалоиди и др.) се осъществява чрез индуциране на програмирана клетъчна смърт (Martins et al., 2008; обзорни статии на Abd El-Hack et al., 2019 и Martínez Andrade et al., 2018). Установено е, че извлечени от микроводорасли метаболити взаимодействат с молекулни мишени в туморните клетки като ДНК, рецепторни протеинкинази, микротубули и протеини на контролните точки на клетъчния цикъл, което води до блокиране на клетъчния цикъл, митохондриални дисфункции, окислително увреждане, промени в мембраната динамика, активиране на каскада от каспази и в крайна сметка до клетъчна смърт. Поради това, метаболити предизвикващи апоптоза имат висока фармакологична стойност за противотуморна терапия. Каротеноиди от *Chlorella ellipsoidea* (главно виолаксантин) и от *Chlorella vulgaris* (главно лутеин), например, предизвикват апоптоза в HCT116 клетки (човешка клетъчна линия от карцином на дебелото черво), доказана по транслокация на фосфатидилсерина на външната повърхност на плазмената мембрана с анексин V-флуоресцеин анализ (Kwang et al., 2008). Zhang et al. (2008) съобщават за антипролиферативен ефект на фукоксантин върху EJ-1 клетки (рак на пикочния мехур) и за включване на апоптоза, характеризираща се с кондензиран хроматин, ядрена фрагментация и апоптотични телца, в допълнение към ДНК стълбица. Доластатини 10 и 15, изолирани от цианопрокариоти, спират клетъчния цикъл в G2/M фаза и индуцират апоптоза чрез промяна в генната експресия, включително активиране на каспаза 3 в белодробни ракови клетки A549 (Catassi et al., 2006) или инхибиране на сглобяването на микротубулите в различни човешки миеломни клетъчни линии

(RPMI8226, U266 и IM9) (Sato et al., 2007). Липопептидът сомоцистинаמיד А (somocystinamide A), изолиран от синьо-зеленото водорасло *Lyngbya majuscula*, е мощен инхибитор на пролиферацията (в μM концентрации) на различни ракови клетъчни линии като левкемия, карциноми на белия дроб и на гърдата, невробластома, миелом и меланом. Антипролиферативната активност до голяма степен се дължи на задействане на каспаза 8-зависим апоптотичен път (Wrasidlo et al., 2008). Lin et al. (2017) изследват ефекта на воден екстракт от *Chlorella sorokiniana* върху две човешки клетъчни линии от белодробен аденокарцином (A549 и CL1-5). Авторите установяват наличие на ранно апоптотични клетки (по анексин V+/PI- оцветяване), активирани форми на каспаза-9 и каспаза-3, и инактивиране (скъсване) на ядрения ензим поли (ADP-рибоза) полимераза (PARP, който сигнализира за наличие на увреждане на ДНК и спомага нейното възстановяване) по което заключават, че екстрактът индуцира смърт на A549 и CL1-5 клетките по митохондрия-медиран апоптотичен път.

Данните относно антитуморен ефект на водораслови продукти от зелени микроводорасли от род *Coelastrella* са оскъдни (Iyer et al., 2015). В настоящия труд за първи път е изследван *in vitro* ефектът на екстракти и метаболити, изолирани от *Coelastrella* sp. BGV, върху пролиферацията на човешки туморни клетки HeLa, както и механизмът на тяхното антитуморно действие.

IV.3.2. Антибактериална и антигъбна активности на водораслови продукти, получени от зеленото микроводорасло *Coelastrella* sp. BGV

IV.3.2.1. Агар - дифузионен метод на Perez et al. (1990). Антибактериалната и антигъбна активности на водораслови продукти от *Coelastrella* sp. BGV - алкохолен екстракт (АЕ), мастни киселини (МК), неосапуняеми вещества (НВ) и културална среда (КС), приложени в концентрация 5 mg/mL, е определена чрез агар - дифузионен метод, срещу тест-бактериите *Staphylococcus aureus* (Gram +) и *Escherichia coli* (Gram -) в сравнение със стандартен антибиотик Gentamicin (0.1 mg/mL) и срещу *Candida albicans* в сравнение със стандартен антибиотик Amphotericin B. Антибактериалната и антигъбна активност е отчетена по диаметъра (mm) на инхибиторните зони в агара след инкубация на 37°C за 24 часа за бактериите и за 48 часа на 30°C за гъбата. Резултатите от проведените опити са представени на Фигура 23 и Таблица 5.



Фигура 23. Антибактериален и антигъбен ефекти на водораслови продукти, получени от *Coelastrella* sp. BGV спрямо *Staphylococcus aureus* (A); *Escherichia coli* (B) и *Candida albicans* (C). 1 - алкохолен екстракт; 2 - мастни киселини; 3 - неосапуняеми вещества; 4 - културална среда; М – хранителна среда, съдържаща 10% DMSO (негативна контрола); G и A – позитивни контроли Gentamicin и Amphotericin B, съответно.

Таблица 5. Зони на инхибиция (диаметър в mm) на патогените *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli* и *Candida albicans*, формирани под действието на изследваните водораслови продукти. Gentamicin и Amphotericin B – положителни контроли.

Проби от <i>Coelastrella</i> sp./концентрация/	ИНХИБИТОРНА ЗОНА (mm)		
	ТЕСТ – МИКРООРГАНИЗМИ		
	Gram (-) бактерии	Gram (+) бактерии	Гъбен щам
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Gentamycin /0.1 mg/mL/	5.0	5.0	-
Amphotericin B /0.1 mg/mL/	-	-	7.0
Алкохолен екстракт (АЕ) /5 mg/mL/	12.0	10.0	10.0
Мастни киселини (МК) /5 mg/mL/	14.0	8.0	8.0
Неосапуняеми вещества (НВ) /5 mg/mL/	4.0	0	0
Културална среда (КС) /5 mg/mL/	0	4.0	0

Срещу *S. aureus*: при два от изследваните 4 микроводораслови продукта се оформя отчетлива инхибиторна зона, - 10 mm в диаметър за АЕ и 8 mm за МК, при 5 mm за положителната контрола Gentamicin, приложена в концентрация от 0.1 mg/mL. Извънклетъчните отделяния на *Coelastrella* sp. BGV (КС) са по-слабо активни (диаметър на зоната на инхибиция 4 mm), а НВ са неактивни срещу тази Грам положителна патогенна бактерия.

Срещу *Escherichia coli* (Грам-отрицателна патогенна бактерия): ясно обособени инхибиторни зони се отчитат за АЕ – с диаметър 12 mm и за МК - с диаметър 14 mm и по-малка зона за НВ - 4 mm, при 5 mm за Gentamicin.

При *Candida albicans* отчетените инхибиторни зони са с диаметър 10 mm за АЕ, 8 mm за МК, и 7 mm за положителната контрола Amphotericin B, използвана в концентрация 0.1 mg/mL.

Най-висока активност (най-голям диаметър на зоната на инхибиране) и най-широк антипатогенен спектър (инхибират растежа на трите тествани патогена) проявяват АЕ и МК на *Coelastrella* sp. BGV. Хранителната среда, съдържаща 10% DMSO, използвана като отрицателна контрола не показва антимикробна и антигъбна активности.

IV.3.2.2. Метод на микроразрежданията в течна среда (Andrews, 2001). Антибактериалната и антигъбна активности на 4-те проби от *Coelastrella* sp. BGV са изследвани и по метода на микроразрежданията в течна среда. Този метод дава възможност за определяне на минималната инхибираща концентрация (МИК), количествен израз на антимикробната активност. МИК на изследваните водораслови

екстракти и метаболити е определяна спектрофотометрично, след серийно двукратно разреждане на пробите в 96-ямови микроплаки, инокулиране с микробните суспензии и инкубиране при подходящи температура и време. Получените резултати са представени в Таблица 6.

Таблица 6. Минимална инхибираща концентрация (МИК) ($\mu\text{g/mL}$) на водораслови продукти от *Coelastrella* sp. BGV срещу *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*.

Проба/Контрола	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
Gentamycin	20$\pm$0.05	20$\pm$0.04	
Amphotericin B			10$\pm$0.05
Алкохолен екстракт (АЕ)	600$\pm$0.2	400$\pm$0.2	500$\pm$0.1
Маслни киселини (МК)	500$\pm$0.1	300$\pm$0.2	600$\pm$0.2
Неосапуняеми вещества (НВ)	0.0	>2500$\pm$0.3	0.0
Културална среда (КС)	>3000$\pm$0.2	0.0	0.0

Всички изследвани водораслови проби, с изключение на КС показват най-висока активност (най-ниски стойности на МИК) срещу Грам-отрицателната бактерия *E. coli*. МИК на МК е 300 $\mu\text{g/mL}$, а на АЕ е 400 $\mu\text{g/mL}$. Неосапуняемите вещества потискат растежа на *E. coli* в пъти по-висока концентрация (МИК>2500 $\mu\text{g/mL}$), но са неактивни срещу другите 2 патогена. Масните киселини са най-активни и срещу Грам-положителния *Staphylococcus aureus* (стойността на МИК е с 20% по-ниска от тази на АЕ и повече от 6 пъти по-ниска от стойността на КС). Ефект срещу *Candida albicans* имат само АЕ и МК, като активността на АЕ е с 20% по-висока.

В изследвания на Гъчева (2012) е установено, че културални среди от *Coelastrella* sp., *Chlorella* sp. и 3B1 проявяват активност срещу *Candida albicans* с МИК 12.5 mg/mL. Воден екстракт от *Scenedesmus quadricauda* потиска растежа на *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus flavus* и *Microsporium canis* със стойност на MIC за всички патогенни гъби 0.4 mg/mL (Al-Rekabi, 2011). Marrez et al. (2019) изследват активността на диетилен етерен екстракт от *Scenedesmus obliquus* срещу 2 Грам-положителни, 4 Грам-отрицателни патогенни бактерии и 9 вида гъби и установяват най-висока активност на екстракта спрямо Грам-отрицателната *Salmonella typhi* и гъбата *Aspergillus steinii* със стойности на MIC съответно 0.5 и 0.6 mg/mL. Етанолни екстракти от 10 щамове зелени микроводорасли от три рода (*Desmococcus*, *Chlorella* и *Scenedesmus*) показват висока антибактериална активност както срещу 3 Грам-положителни, така и срещу 4 Грам-отрицателни бактерии, със стойности на MIC

вариращи от 0.001 до >0.125 mg/mL (Ördög et al., 2004). Mendiola et al. (2008) сравняват активността на екстракти с въглероден диоксид (при различно екстракционно налягане и температура) от зеленото микроводорасло *Dunaliella salina* срещу *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* и *Aspergillus niger*. Авторите установяват, че съставът на екстрактите, а оттам и тяхната антимикробна активност се променят в зависимост от екстракционните условия. При прилагане на 314 бара и 9.8°C активността на водорасловия екстракт е най-висока, със стойности на минималната бактерицидна/фунгицидна концентрация (МБК/МФК, в mg/mL) от 3.1 ± 0.4 (*E. coli*), 3.9 ± 0.3 (*S. aureus*), 8.3 ± 0.4 (*C. albicans*) и 30.0 ± 0.5 (*A. niger*). В подобно изследване, проведено с *Haematococcus pluvialis*, най-висока антимикробна активност е отчетена за етанолен екстракт, получен под налягане и 100°C от червените хематоцисти на *Haematococcus*, със стойности на МБК/МФК от 1.9 ± 0.1 mg/mL (*E. coli*), 2.5 ± 0.2 mg/mL (*S. aureus*), 3.9 ± 0.3 mg/mL (*C. albicans*) и 12.8 ± 0.7 mg/mL (*A. niger*) (Santoyo et al., 2009).

Сравнителният анализ показва, че резултатите за антибактериална и антигъбна активност на пробите от *Coelastrella* sp. BGV, получени с прилагане на прецизния количествен метод на микроразрежданията в течна среда напълно потвърждават данните от полуколичествения агар-дифузионен метод. Това прави използването на полесните и бързи агар-/диск-дифузионни методи подходящи при по-мощно изследване на антипатогенната активност на водораслови проби (когато броят на пробите и на тест-микроорганизмите е по-голям).

IV.3.2.3. Диск-дифузионен метод на Essawi and Srour, (2000). Антибактериалната и антигъбна активности на мастни киселини (МК), алкохолен екстракт (АЕ) и културална среда (КС) и в допълнение, на нискотемпературен воден екстракт (НТ) и екзополизахарид (ЕПЗХ) от *Coelastrella* sp. BGV са изследвани и чрез диск-дифузионен метод, като е разширен спектърът на тест-патогените. Използвани са 9 бактериални щамове, от които 2 Грам-положителни (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*) и 7 Грам-отрицателни (*Escherichia coli* ATCC, *Escherichia coli* UPEC, *Escherichia coli* EPEC, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*), и 1 гъбен щам - *Candida albicans*. Антибактериалната и антигъбна активност е отчетена по диаметъра (mm) на получените инхибиторни зони в агара, след 24 часа инкубиране при 37°C за бактериалните щамове и след 48 часа култивиране за гъбния патогенен щам при 30°C. Резултатите са представени на Таблица 7.

От Таблица 7 се вижда, че изследваните 3 екстракта и 2 метаболита от *Coelastrella* sp. BGV показват различна по степен антимикробна активност към тестваните патогенни микроорганизми, като инхибират растежа на голям брой от тях.

Алкохолен екстракт от *Coelastrella* sp. BGV е активен срещу 6 бактериални щамове - 5 Грам - (*E. coli* ATCC, *E. coli* UPEC, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*), 1 Грам + (*B. cereus*), и към *C. albicans*. (Табл. 7).

МК са активни срещу 3 Грам - бактериални щамове (*E. coli* UPEC, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*), 1 Грам + (*B. cereus*), и към *C. albicans* (Табл. 11). КС е с активност срещу Грам-отрицателните *E. coli* UPEC, *Proteus mirabilis* и *P. aeruginosa* и към *C. albicans*. ЕПЗХ показва активност срещу 2 Грам - бактериални щамове (*Proteus mirabilis* и *P. aeruginosa*) и 1 Грам + (*B. cereus*), както и срещу *C. albicans*. За НТ воден екстракт е отчетена антимикробна активност срещу Грам-отрицателните *Proteus mirabilis* и *P. aeruginosa*, и към *C. albicans*. (Табл. 7).

Най-широк антибактериален спектър от петте проби от *Coelastrella* sp. BGV показва алкохолният екстракт, който е активен срещу 6 от тестваните 9 бактериални щамове, последван от мастните киселини, които потискат развитието на 4 бактериални

щамата. ЕПЗХ и КС инхибират развитието на 3 от изследваните бактериални щамата, а НТ екстракт – на два.

Таблица 7. Антимикробна активност на продукти от *Coelastrella* sp. BGV

Проби от <i>Coelastrella</i> sp./концентрация/	ИНХИБИТОРНА ЗОНА (mm)									
	ТЕСТ – МИКРООРГАНИЗМИ									
	Gram (-) бактерии							Gram (+) бактерии		Гъбен щам
	<i>E. coli</i> ATCC	<i>E. coli</i> UPEC	<i>E. coli</i> EP EC	<i>S. typhi</i> murium	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Ниско температурен воден екстракт (НТ) /35 mg/mL/	0	0	0	0	10/17*	8	0	0	0	8
ЕПЗХ /20 mg/mL/	0	0	0	0	9	10/18*	0	10/15*	0	7
Културална среда (КС) /20 mg/mL/	0	9/12*	0	0	12/30*	8	0	0	0	7
Алкохолен екстракт (АЕ) /25 mg/mL/	9/14*	8	0	0	13	7	9	7	0	9
Масни к-ни (МК) /8 mg/mL/	0	11/25*	0	0	0	11/22*	15	10	0	9

*Бактериостатично действие на екстракта (диаметър на бактериостатичната зона).

Въпреки, че алкохолният екстракт инхибира растежа на по-голям брой тествани микроорганизми (6 щам), пробата от мастни киселини (4 щам) демонстрира по изразена (отчетлива) антибактериална активност към тестваните микроорганизми, по отношение големината (размера) на отчетените инхибиторни зони. Диаметърът на зоните на инхибиране при мастните киселини се движи в диапазон от 10 до 15 mm, а при алкохолния екстракт – от 8 до 13 mm. От всички изследвани продукти от *Coelastrella* sp. BGV, най-висока антибактериална активност (инхибиторна зона с диаметър 15 mm) е отчетена при пробата от мастни киселини срещу *K. pneumoniae* (Табл. 7).

Както установихме, липидният екстракт от *Coelastrella* sp. BGV съдържа над 70% ненаситени МК. По-ранни проучвания доказват антибактериална активност на ненаситени МК и от други зелени микроводорасли, например *Haematococcus pluvialis* (Rodriguez-Meizoso et al., 2010) и *Chlorococcum* sp. HS-101 (Bhadury and Wright, 2004).

Най-чувствителни от тестваните бактериални щамове са *Pseudomonas aeruginosa* и *Proteus mirabilis*, тъй като растежът им се инхибира от 5 и съответно от 4 водораслови проби. Най-висока активност срещу *Pseudomonas aeruginosa* отново се регистрира при пробата от мастни киселини (зона на инхибиране с диаметър 11 mm), а срещу *Proteus mirabilis* при алкохолния екстракт (зона на инхибиране с диаметър 13 mm). *Escherichia coli* щам ЕРЕС, *Salmonella typhimurium* и *Staphylococcus aureus* са устойчиви, докато *C. albicans* е чувствителна на действието на петте водораслови проби. Регистрираните зони на инхибиране на *C. albicans* са с най-голям диаметър при двете най-активни проби – мастни киселини и алкохолен екстракт (по 9 mm) (Табл. 7).

Изследваните чрез двата метода (агар-дифузионен и диск-дифузионен) водораслови екстракти и метаболити показват различна по степен антибактериална и антигъбна активност срещу Грам-положителни, Грам-отрицателни патогени и *C. albicans*, като инхибират растежа на голям брой от тях (Табл. 5 и Табл. 7). Прави впечатление високият терапевтичен потенциал на мастни киселини и алкохолен екстракт от *Coelastrella* sp. BGV срещу един от най-значимите Грам-отрицателни патогени, какъвто е *Escherichia coli*, срещу *Pseudomonas aeruginosa* и *Proteus mirabilis*, и срещу гъбни инфекции, причинени от *Candida albicans*.

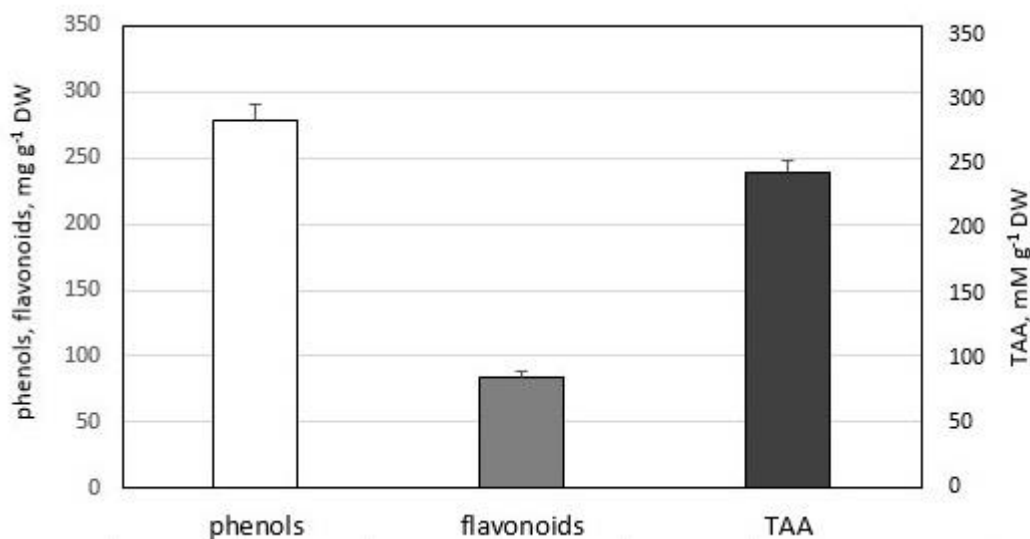
При други зелени микроводорасли (*Chlorella* sp., *Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus incrassatulus*, 3B1, *Coelastrella* sp.), изследвани по метода на агаровите ямки, е установена активност на МК в концентрация от 20 mg/mL само срещу Грам-положителни бактерии (*S. aureus* и *Streptococcus pyogenes*) с диаметър на инхибиторните зони от 6 до 15 mm (Гъчева, 2012; Najdenski et al., 2013). Под действието на екстракти от *Chlorella vulgaris* са измерени зони на инхибиране с диаметър, вариращ от 3 до 9 mm, в зависимост от разтворителя (етанол, метанол, хлороформ и диетил етер), както и от тест-патогена (10 Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии) (Dineshkumar et al., 2017). Културална течност от *Heterochlorella luteoviridis* потиска растежа на *C. albicans*, формирайки зона с диаметър по-малък от 10 mm (Mudimu et al., 2014). Bhagavathy et al. (2011) установяват, че екстракти с 8 различни органични разтворители и пигментите β -каротен, хлорофил *a* и хлорофил *b* от зеленото микроводорасло *Chlorococcum humicola* инхибират растежа на *C. albicans*, *Aspergillus flavus* и *Aspergillus niger*, като диаметърът на зоните варира от 7 до 20 mm за екстрактите и от 7 до 11 mm за пигментите. Изследван с диск-дифузионен метод, диетилетерен екстракт от *Scenedesmus obliquus* показва активност срещу 2 Грам-положителни, 4 Грам-отрицателни патогенни бактерии и 9 вида гъби с диаметър на зоните на инхибиране на бактериалните патогени между 12.5 mm и 19.5 mm а на гъбите между 8.7 mm и 18.3 mm (Marrez et al., 2019).

IV.3.3. Антиоксидантна активност (АО) на алкохолен екстракт (АЕ) от *Coelastrella* sp. BGV.

Алкохолният екстракт от *Coelastrella* sp. BGV показва висока антитуморна и антибактериална активност, което ни даде основание да изследваме неговият антиоксидантен потенциал.

Антиоксидантната активност е определена по показатели, характеризиращи състоянието на антиоксидантната защитна система на клетките – общо количество на феноли и флавоноиди, и тотална антиоксидантна активност (ТАА). Резултатите са представени на Фигура 30.

Резултатите показват високо съдържание на общи феноли и флавоноиди и високо ниво на тотална антиоксидантна активност за алкохолен екстракт, получен от биомасата на *Coelastrella* sp. BGV. Фенолното съдържание и съдържанието на каротеноиди корелират с високия антиоксидантен капацитет, което е указание, че тези съединения допринасят съществено за общата антиоксидантната активност на микроводораслото.



Фигура 24. Общи феноли (mg/g^{-1} DW), флавоноиди (mg/g^{-1} DW) и обща антиоксидантна активност (mM/g^{-1} DW) в алкохолен екстракт, получен от биомаса на *Coelastrella* sp. BGV

Maadane et al. (2015) изследват антиоксидантната активност на екстракти с 3 различни разтворителя, получени от 9 щам микроводорасли, използвайки DPPH анализ. Деветте етанолни екстракта показват значително по-висока активност от екстрактите с етанол/вода и вода, като тези от *Tetraselmis* sp, *Dunaliella salina* и *Navicula* sp. са с най-високата антирадикална активност. В етанолния екстракт от *Nannochloropsis gaditana* е установено най-високо фенолно съдържание (32.0 ± 0.5 mg GAE/g екстракт), следван от *Tetraselmis* sp. с 25.5 ± 1.5 mg GAE/g. Етанолните екстракти от *Dunaliella* sp., *Phaeodactylum tricornutum* и *Navicula* sp. имат общо фенолно съдържание повече от 15 mg GAE/g, докато най-ниско фенолно съдържание е намерено в екстракт от *Chlorella* sp. (8.1 ± 0.1 mg GAE/g). Количеството общи феноли в алкохолния екстракт от *Coelastrella* sp. BGV значително надвишава и стойностите, измерени в екстракти от цианопрокарите *Nostoc commune* and *Arthronema africanum* (Petrova et al., 2020). В изследване на Sawant and Mane (2018) е установено, че от 7 различни екстракта, получени от *Chlorella emersonii* KJ725233, метанолният екстракт е

с най-висок антимикробен потенциал срещу тестваните Грам-положителни, Грам-отрицателни бактериални щамови и гъбни патогени. Този извлек показва най-висок антиоксидантен потенциал, както и най-високо съдържание на феноли (5.19 ± 0.10 mg GAE/g DW) и флавоноиди (24.60 ± 1.18 mg QE/g DW). Етилацетатни екстракти от *Nannochloropsis oculata* и *Gracilaria gracilis* са богати на флавоноидни съединения (71.79 ± 2.32 и 66.48 ± 1.87 mg QE/g екстракт), докато техните метанолни екстракти съдържат по-малки количества (42.08 ± 1.09 и 26.47 ± 1.203 mg QE/g екстракт, съответно). Максималните и минималните количества общи феноли принадлежат на етилацетатния екстракт от *N. oculata* и на метанолния екстракт от *G. gracilis* (41.45 ± 1.42 и 29.39 ± 2.01 mg GAE/g екстракт) (Ebrahimzadeh et al., 2018). В сравнение с други микроводорасли, *Coelastrella* sp. BGV се представя като потенциален богат източник на естествени антиоксиданти.

Алкохолният екстракт, получен от биомасата на *Coelastrella* sp. BGV проявява високи антиоксидантна, антитуморна, антибактериална и антигъбна активности и определянето на химичния му състав и идентифицирането на съединенията, отговорни за биологичната му активност са подходящи задачи за бъдещи изследвания.

Резултатите от проведените и описани в дисертационния труд изследвания върху възможностите на *Coelastrella* sp. BGV да расте бързо, да натрупва биомаса, да произвежда вещества с антитуморно, антибактериално, антигъбно и антиоксидантно действие и сравняването им с литературни данни от сходни изследвания на други, главно зелени микроводорасли показват, че този български щам е с висок потенциал за получаване на биомаса и продукти от нея за бъдещо приложение в практиката.

Получените резултати са в подкрепа на идеята, че проучване на новоизолирани микроводорасли, както и разширяване на изследванията на такива, показващи потенциал като *Coelastrella* sp. BGV, ще спомогнат за по-пълното използване на този богат биоресурс за получаване на ефективни и полезни за здравето и практиката продукти.

V. ИЗВОДИ

1. От изследваните 4 щамове зелени микроводорасли от род *Coelastrella* - *Coelastrella* sp. BGV, *Coelastrella multistriata* var. *corcontica* (CCALA 308), *Coelastrella multistriata* var. *multistriata* (CCALA 309) и *Coelastrella vacuolata* (CCALA 356), с най-висок растежен потенциал в лабораторни условия е българският щам *Coelastrella* sp. BGV.

2. Качественият състав на биомасата на *Coelastrella* sp. BGV в експоненциална и стационарна фаза на растеж е количествено балансиран, което заедно с високата продуктивност прави този щам перспективен в биотехнологично отношение.

3. В липиден екстракт от *Coelastrella* sp. BGV са идентифицирани 11 мастни киселини, от които в най-голямо количество са олеинова (C18:1), линолова (C18:2) и палмитинова (C16:0). Съотношението на ненаситените към наситените мастни киселини е 3:1, а на мононенаситените към полиненаситените мастни киселини е 1:1.

4. Екзополизахаридът от *Coelastrella* sp. BGV е нискомолекулен, съставен преимуществено от неутрални захари. Участващите в химичния му състав монозахариди са седем, от които са идентифицирани два – галактоза и фукоза.

5. Извънклетъчни отделяния и компоненти на биомасата на *Coelastrella* sp. BGV показват висока биологична активност в опити *in vitro*.

6. Изследваните продукти, получени от *Coelastrella* sp. BGV, показват различна по-степен антитуморна/антипролиферативна активност към HeLa човешки туморни клетки (цервикален аденокарцином), отчетена чрез МТТ тест.

6.1. Най-висок статистически значим антитуморен ефект се отчита за мастни киселини (МК), последвани от алкохолен екстракт (АЕ), неосапуняеми вещества (НВ) и екзополизахариди (ЕПЗХ) на двата времеви интервала на изследване, като ефектът на МК (на 24 час и 48 час) и НВ (на 48 час) е съизмерим с този на класическия цитостатик Doxorubicin.

6.2. Извънклетъчни отделения в културалната среда (КС), нискотемпературен (НТ) и високотемпературен (ВТ) водни екстракти понижават статистически значимо жизнеността на HeLa туморни клетки и на двата времеви интервала, като ефектът на НТ, ВТ и маслен екстракт (МЕ) е по-силен на 24-ти час, а на КС е 2-3 пъти по-изразен на 48-ми час.

7. Третирането на HeLa човешки туморни клетки с екстракти и метаболити от *Coelastrella* sp. BGV предизвиква различни по степен морфологични изменения в клетката и ядрото, характерни за ранна- и/или късна апоптоза, установени чрез прилагане на флуоресцентни методи на изследване (двойно оцветяване с АО и EtBr и оцветяване с DAPI).

8. Резултатите от флуоресцентните методи на изследване са в съответствие с данните, получени от МТТ теста и показват, че продуктите, изолирани от българския щам *Coelastrella* sp. BGV осъществяват антитуморно действие спрямо HeLa туморни клетки чрез индукция на апоптоза.

9. Получени са обнадеждаващи резултати по отношение на терапевтичен потенциал на екстракти и метаболити от *Coelastrella* sp. BGV (алкохолен екстракт, мастни киселини, екзополизахарид и културална среда) срещу широк спектър от Грам-отрицателни и Грам-положителни бактерии, както и гъбни инфекции, причинени от *Candida albicans*. Най-висока активност е отчетена за МК и АЕ.

10. Алкохолният екстракт от биомасата на *Coelastrella* sp. BGV е с високо съдържание на общи феноли, флавоноиди и високо ниво на тотална антиоксидантна активност.

11. Получените резултати за антитуморна, антибактериална и антигъбна активности на екстракти и метаболити от *Coelastrella* sp. BGV показват перспективността на този български щам за бъдещо приложение в практиката.

VI. ПРИНОСИ

1. Разширена и обогатена е биохимичната характеристика на българския щам зелено микроводорасло *Coelastrella* sp. BGV. Характеризиран е химичният състав на биомасата в две фази на растеж - експоненциална и стационарна. За първи път е изолиран екзополизахарид.

2. Характеризирани са мастно-киселинният профил на липиден екстракт и химичният състав на ЕПЗХ от *Coelastrella* sp. BGV.

3. Получени са оригинални данни за биологична активност на екстракти и метаболити от *Coelastrella* sp. BGV.

4. За първи път е установена антитуморна активност на екстракти и метаболити от *Coelastrella* sp. BGV спрямо HeLa човешки туморни клетки в опити *in vitro*.

5. Установена е висока антитуморната активност на мастни киселини, неосапуняеми вещества, алкохолен екстракт и екзополизахариди от *Coelastrella* sp. BGV. Активността на мастни киселини и неосапуняеми вещества срещу HeLa туморни

клетки е съизмерима с тази на широко използвания в клиничната практика антитуморен антибиотик Doxorubicin.

6. За първи път е установена антибактериална активност на мастни киселини и етанолен извлек от щам *Coelastrella* sp. BGV, спрямо Грам-отрицателни патогени (*E. coli* ATCC, *E. coli* UPEC, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*).

7. Установено е, че *Coelastrella* sp. BGV е богат източник на естествени антиоксиданти.

8. Българският щам зелено микроводорасло *Coelastrella* sp. BGV е потенциален източник на биомаса и продукти от нея, приложими при създаване на нови природни лекарствени препарати за лечение на тумори и бактериални инфекции в експериментални и клинични условия.

VII. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

VII.1. Публикувани в научни издания, реферирани и индексирани в световноизвестна база данни с научна информация

1. **Toshkova-Yotova, T.,** A. Georgieva, P. Pilarski, R. Toshkova. Aqueous extracts of green microalga *Coelastrella* sp. BGV display antiproliferative and proapoptotic activity in vitro against HeLa tumor cells. *Compt.Rend. Acad.Bulg. Sci.* 2019, **in press**, ISSN (print) 1310-1331; ISSN (online) 2367-5535; Impact Factor IF- 0.321/2018, SJR- 0.21/2018; Q2

2. **Toshkova-Yotova, T.,** S. Alexandrov, P. Pilarski, L. Yocheva, D. Petrova, G. Chaneva. Screening of antimicrobial and antioxidant properties of green microalga *Coelastrella* sp. BGV. *Oxidation Communications*, 2020, 43, No 2, 265-279, ISSN 02094541; SJR- 0.21/2018; Q3

VII.2. Участия в национални и международни форуми

1. **Toshkova-Yotova, T.,** A. Georgieva, P. Pilarski, R. Toshkova. Antiproliferative and proapoptotic activity of water extracts obtained from green microalga *Coelastrella* sp. BGV against HeLa tumor cells. Proceedings of the thirteenth workshop with international electronic participation: Biological activity of metals, synthetic compounds and natural products, 19-21 November, 2018, ISSN: 2367-5683. (доклад)

2. **Toshkova-Yotova, T.,** A. Georgieva, P. Pilarski, R. Toshkova. Antitumor activity of exopolysaccharides isolated from green microalga *Coelastrella* sp. BGV. International Scientific Conference "Tradition and Modernity in Veterinary Medicine", 12 – 14.04.2019, Yundola, Bulgaria, poster P1MELB2, p.21-22

3. Petrova, D., L. Yocheva, M. Petrova, **T. Toshkova-Yotova,** Z. Karcheva, Z. Georgieva, P. Pilarski, G. Chaneva. Assessment of antimicrobial activity of Bulgarian microalgal strains. 8th International Symposium of Ecologists, Budva, Montenegro, 2-5 October 2019. (постер)

4. **Toshkova-Yotova, T.,** A. Georgieva, K. Todorova, P. Pilarski, R. Toshkova. Antitumor properties of vegetable oil extract from green microalga *Coelastrella* sp. BGV. Second International Conference Veterinary Medicine in service of people, October, 18-19, 2019; Stara Zagora, Bulgaria. (постер)

VIII. ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА

- Гъчева, Г., 2012. Дисертация, ИФРГ-БАН, 144 стр.
- Драганова, П., 2018. Дисертация, ИФРГ-БАН, 108 стр.
- Петков, Г. Д., 1990. Канд. дисертация, ИФР “М. Попов”, БАН, 119 стр.
- Abd El Baky, H., G. El-Baroty & E. Ibrahim, 2014. *Der Pharma Chemica*, 6(5), 24–34.
- Abd El-Hack, M. E., S. Abdelnour, M. Alagawany, M. Abdo, M. A. Sakr, A. F. Khafaga, S. A. Mahgoub, S. S. Elnesr & M. G. Gebriel, 2019. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 42–50.
- Abdel Wahab, S. I., A. B. Abdul, A. S. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009, 1110-7243:769568 DOI:10.1155/2009/769568
- Abe, K., H. Hattori & M. Hirano, 2007. *Food chemistry*, 100(2), 656-661.
- Al-Rekabi H. Y., 2011. *Journal of Thi-Qar University*, 6(4), 35e42.
- Andrews, J. M., 2001. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 (suppl 1), 5–16.
- Andrews, J. M., 2001. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 (suppl 1), 5–16.
- Anthon, G. E. & D. M. Barrett, 2008. *Food chemistry*, 110(1), 239-247.
- Arad, S. M. & O. Levy-Ontman, 2010. *Current opinion in biotechnology*, 21(3), 358-364. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2010.02.008>
- Bernaerts T. M. M., L. Gheysen, C. Kyomugasho, Z. J. Kermani, S. Vandionant, I. Foubert, M. E. Hendrickx & A. M. Van Loey, 2018. *Algal Research* 32, 150–161.
- Bhadury, P. & P. C. Wright, 2004. *Planta*, 219, 561–578.
- Blumenkrantz, N. & G. Asboe-Hansen, 1973. *Analytical biochemistry*, 54(2), 484-489.
- Bradford, M. M. (1976). *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Catassi, A., A. Cesario, D. Arzani, P. Menichini, A. Alama, C. Bruzzo, A. Imperatori, N. Rotolo, P. Granone, P. Russo, 2006. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63, 2377–2386.
- Chang, C. C., M. H. Yang, H. M. Wen & J. C. Chern, 2002. *Journal of food and drug analysis*, 10(3), 178–182.
- Dai, J., Y. Wu, Sh. Chen, S. Zhu, H. Yin, M. Wang & J. Tang, 2010. *Carbohydrate Polymers* 82, 629–635.
- Dimitrova, P. H., M. P. Stoyneva-Gärtner, B. A. Uzunov, G. Gärtner, 2018. *Acta zoologica bulgarica*, Suppl., 11, 27–42
- Dineshkumar, R., R. Narendran, P. Jayasingam & P. Sampathkumar, 2017. *Journal of Aquaculture & Marine Biology*, 5(3), 00119.
- DuBois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers & F. Smith, 1956. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Essawi, T. & M. Srouf, 2000. *Journal of Ethnopharmacology*, 70(3), 343–349.
- Fabregas, J., D. Garcia & M. Fernandez-Alonso, 1999. *Antiviral Research*, 44(1), 67–73.
- Georgiev, D., H. Dilov & S. Avramova, 1978. *Hydrobiologia*, 7, 14-23.
- Gigova, L. G., R. A. Toshkova, E. G. Gardeva, G. V. Gacheva, N. J. Ivanova, L. S. Yossifova & G. D. Petkov, 2011. *Journal of Pharmacy Research*, 4, (12), 4702-4707.
- Honda, S., E. Akao, S. Suzuki, M. Okuda, K. Takehi, J. Nakamura, 1989. *Analytical biochemistry*, 180(2), 351-357.
- Hu, C. W., L. T. Chuang, P. C. Yu & C. N. N. Chen, 2013. *Food chemistry*, 138(4), 2071-2078.
- Iyer, G., V. Nagle, Y. V. Gupte, S. Desai, M. Iyer, N. Moramkar & V. Sawant, 2015. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(10), 527-536.
- Kang, C. D., & S. J. Sim, 2008. *Biotechnology Letters*, 30(3), 441-444.
- Karpagam, R., K. J. Raj, B. Ashokkumar & P. Varalakshmi, 2015. *Bioresource Technology*, 188, 177–184.

- Klavons, J. A. & R. D. Bennett, 1986. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(4), 597-599.
- Kwang, H. C., Y. I. K. Song & D. U. Lee, 2008. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10521–10526.
- Levasseur, M., P. Thompson, P. Harrison, 1993. *Journal Phycology*, 29 (5), 587-595.
- Li, Y., W. Zhou, B. Hu, M. Min, P. Chen & R. R. Ruan, 2011. *Bioresource technology*, 102(23), 10861-10867.
- Lowry, O., N. Rosenbrough, A. Z. Farr & R. J. Randball, 1951. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Luo, L., H. He, C. Yang, S. Wen, G. Zeng, M. Wu, Z. Zhou & W. Lou, 2016. *Bioresource Technology*, 216, 135–141.
- Maadane, A., N. Merghoub, T. Ainane, H. El Arroussi, R. Benhima, S. Amzazi, Y. Bakri & I. Wahby, 2015. *Journal of Biotechnology*, 215, 13–19.
- Mackinney, G., 1941. *Journal of Biological Chemistry*, 132(1), 91-109.
- Marrez, D. A., M. M. Naguib, Y. Y. Sultan, A. M. Higazy., 2019. *Heliyon*, 5, e01404.
- McComb, E. A. & R. M. McCready, 1957. *Analytical Chemistry*, 29(5), 819-821.
- Mendiola, J. A., S. Santoyo, A. Cifuentes, G. Reglero, E. Ibáñez & F. J. Señoráns, 2008. *Journal of Food Protection*, 71, 2138–2143.
- Minhas A. K., P. Hodgson, C. J. Barrow & A. Adholeya, 2020. *Bioresource Technology Reports*, 9, 100366.
- Morineau-Thomas, O., P. Jaouen & P. Legentilhomme, 2002. *Bioprocess and biosystems engineering*, 25(1), 35-42. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-001-0278-1>.
- Mossmann, T., 1983. *Journal Immunological Methods*, 65, 55–63.
- Najdenski, H.M., L.G. Gigova, I.I. Iliev, P.S. Pilarski, J. Lukavsky, I.V. Tsvetkova, M.S. Ninova, V. K Kussovski, 2013. *International journal of food science & technology*, 48(7), 1533-1540.
- Ördög, V., W. Stirk, R. Lenobel, M. Bancířová, M. Strnad, J. van Staden, J. Szigeti & L. Németh, 2004. *Journal of Applied Phycology*, 16, 309–314.
- Perez, C., M. Pauli, P. Bazerque, 1990. *Acta Biologiae et Medecine Experimentalis*, 15, 113-115.
- Prieto, P., M. Pineda, M. Aguilar, 1999. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337–341. doi:10.1006/abio.1999.4019
- Rao, A. R., R. Sarada & G. A. Ravishankar, 2007. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(6), 957-965.
- Razooki, Z. H., M. K. Al-Mashhadani, & I. J. Abed, 2020. *Materials Today: Proceedings*, 20, 621-626.
- Rodriguez-Meizoso, I., L. Jaime, S. Santoyo, F. J. Senorans, A. Cifuentes & E. Ibanez, 2010. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 456–463.
- Sato, M., M. Sagawa, T. Nakazato, Y. Ikeda & M. Kizaki, 2007. *International Journal of Oncology*, 30, 1453–1459.
- Setlik, I., 1967. *Annual Report of Algology for the Year 1966*. Trebon, CSAV, Institute of Microbiology, pp. 89-100.
- Sheng, J., F. Yu, Z. Xin, L. Zhao, X. Zhu & Q. Hu, 2007. *Food Chemistry* 105, 533–539.
- Silambarasan, T., M. Kumaran, D. Kalaichelvan & R. Dhandapani, 2014. *International Journal of Advanced Science and Engineering*, 1, 37e40.
- Singleton, V. L., R. Orthofer & R. M. Lamuela-Raventós, 1999. *Methods in Enzymology*, 152–178. doi:10.1016/s0076-6879(99)99017-1
- Wrasidlo, W., A. Mielgo, V. A. Torres, S. Barbero, K. Stoletov, T. L. Suyama, R. L. Klemke, W. H. Gerwick, D. A. Carson & D. G. Stupack, 2008. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 2313–2318.

- Xiao, R., Y. Zheng, 2016. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1225-1244.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.004>.
- Xie, Q. S., H. P. Yin, X. Chen, C. H. Xie & M. Wang, 2005. *Pharmaceutical Biotechnology*, 12(4), 242–247.
- Xue, Q. R., H. P. Yin, M. Wang & Y. Xu, 2003. *Pharmaceutical Biotechnology*, 10(2), 96–99.
- Yang, T. Y., G. L. Jenn-yu, C. L. Chen, 2005. *U.S. Patent No. 6,839,247*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Zhang, M., S. W. Cui, P. C. K. Cheung & Q. Wang, 2007. *Trends in Food Science & Technology*, 18(1), 4–19.
- Zhang, Z., P. Zhang, M. Hamada, S. Takahashi, G. Xing, J. Liu & N. Sugiura, 2008. *Oncology Reports*, 20, 1099–1103.
- Zhu, L., Z. Wang, Q. Shu, J. Takala, E. Hiltunen, P. Feng & Z. Yuan, 2013. *Water Research*, 47(13), 4294–4302.