

ПРИЛОЖЕНИЕ 9

РАБОТНА ПРОГРАМА ЗА ТРЕТИ ЕТАП

Изпълнението на част от предвидените дейности по проекта за втория етап беше блокирано поради коронавирусната инфекция от март 2020 г. Ето защо, предлаганата Работна програма, при финансиране на трети етап на проекта, представлява актуализирана Работна програма от втория етап. Това има за цел изпълнение на вече поетите ангажменти от постдокторанта за целия период на проекта. Освен това, ще позволи следването на логично конструиран експериментален дизайн, гарантиращ по-бързото публикуване на резултатите в престижни специализирани научни журнари, с импакт фактор и в по-добри квартали. Допълнително, периодът за изпълнение на третия етап на проекта е по-кратък.

1. Провеждане на хроматографско пречистване и фракциониране поотделно на изследваните през двата етапа полизахаридни комплекси от листата на кръвния здравец (GSL-PSC) и плодните тела на сърнелата (MP-PSC).
2. Първична химична характеристика на вече пречистените полизахаридни фракции от корените на кръвния здравец (GSR-PSC) през втория етап на проекта и на новополучените фракции от GSL-PSC и MP-PSC - определяне на общи захари, общи уронови киселини, монозахариден състав, молекулна маса и хетерогенност, наличие на естери, общ белтък и общи феноли.
3. Изследване на биологичната активност на пречистените полизахаридни фракции.
 - 3.1. Определяне на евентуалното замърсяване на фракциите с липополизахариди.
 - 3.2. Определяне на имуномодулиращата активност на фракциите.
 - 3.3. Оценяване на активирането на човешки левкоцити от избрани (по добив) фракции, върху които са показали активност съответните изходни комплекси през първия и втория етапи.
 - 3.4. Оценяване на *in vitro* цитотоксичното действие на избрани фракции срещу човешки туморни клетъчни линии, върху които са показали активност съответните изходни комплекси през първия етап.
 - 3.5. Определяне на активността на избрани фракции върху образуването на биофилми от пробиотични и патогенни микроорганизми, върху които са показали активност съответните изходни комплекси през втория етап.
4. Изследване на връзката структура-активност на пречистените полизахаридни фракции от един от комплексите - GSR-PSC, GSL-PSC или MP-PSC.
 - 4.1. Провеждане на FT-IR и двумерен ЯМР спектроскопски анализи за частично изследване на първичната структура на най-активните пречистени полизахаридни фракции.
 - 4.2. Провеждане на специфични ензимни модификации на избрана фракция от гъбните неутрални хетерополизахариди (с глюкоманан- и/или фукогалактан-разграждащи ензими), на пектиновите полизахариди от корените или листата на здравеца (с хомогалактуронан- и рамногалактуронан-разграждащи ензими).

- 4.3. Хроматографско разделяне на ензимно-модифицираните продукти и определяне на техния монозахариден състав.
- 4.4. Оценяване на имуномодулиращия и пребиотичния потенциали на избрани (по добив) структурно модифицирани фракции по установените методи.
5. Приготвяне на лиофилизиран полизахарид-съдържащ екстракт от сърнелата или здравеца (корени или листа).
- 5.1. Фитохимичен анализ на полизахаридния екстракт чрез определяне на общи феноли, общи флавоноиди, съдържание на индивидуални фенолни киселини и флавоноиди, органични киселини, свободни захари и общи полизахариди.
- 5.2. Определяне на *in vitro* антиоксидантната и антимикробната активности на получения екстракт.
6. Представяне на проекта и изготвяне на крайния отчет.
- 6.1. Подготвяне и подаване за рецензиране на една експериментална научна статия с импакт фактор в списание от издателство Elsevier.
- 6.2. Представяне на получените резултати на една научна конференция в страната и на една конференция в чужбина.
- 6.3. Изготвяне на крайния отчет.

Кратка обосновка на работния план

В Работната програма са включени дейности, които са логично продължение на експериментите от първия и втория етапи на постдокторантския проект. Хроматографското пречистване и фракциониране на полизахаридите от билката кръвен здравец и ядливата гъба сърнела ще позволи тяхното получаването в сравнително чист вид за последваща химична характеристика и оценка на биологичната активност. Активните пречистени полизахаридни фракции върху човешки левкоцити и туморни клетки, ще бъдат тествани върху пробиотични бактерии и патогени. Ограничен брой полизахариди, които проявяват едновременно имуномодулиращи свойства и стимулират образуването на биофилми от пробиотични бактерии или инхибират формирането на биофилми от патогенни щамове, ще бъдат избрани за изследване на връзката структура-активност. Структурата на най-активните фракции ще бъде изследвана чрез ЯМР спектроскопия, като една от обещаващите фракции ще бъде подложена на ензимна модификация. След това ще бъде оценена биологичната активност на модифицираните продукти. Провеждането на ензимна модификация ще спомогне за изясняването на връзката структура-биологична активност.

Накрая се планува получаване, фитохимична характеристика и оценка на биологичната активност на полизахарид-съдържащ екстракт от суровината, чиито пречистени полизахариди са показали най-висока биологична активност. Това има за цел търсене на приложение в практиката на получените резултати, тъй като водните билкови екстракти се използват във функционалното, диетичното хранене на човека и биофармацията.

Изпълнението на предлаганата Работна програма е планирано за периода от 15.03.2021 г. до края на декември на същата година.

Научно сътрудничество в страната и чужбина

При изпълнението на дейностите през третия етап на проекта ще се работи в тясно сътрудничество с колеги от различни лаборатории на ИОХЦФ-БАН, Университет по хранителни технологии – Пловдив, Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“, Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, Институт по биофизика към Чешката академия на науките (ЧАН) и Университет на Осло. Това е необходимо с цел използване на експертното мнение на водещи учени, и специфично аналитично оборудване. Ако международната епидемиологична обстановка позволява, ще бъде реализирана кратка мобилност на постдокторанта в Институт по биофизика към ЧАН за провеждане на биологични анализи, свързани с плануваните дейности в Работната програма на проекта.