

Списък от резюмета на публикации на английски и български език на гл. ас. д-р Цветелина Паунова-Кръстева

кандидат в конкурс за академична длъжност „Доцент“
обявен за нуждите на Департамент по „Обща микробиология“,
лаборатория „Клетъчна микробиология“,
Професионално направление 4.3 Биологически науки,
ДВ бр. 12/12.02.2021 г.

(съгласно минималните национални критерии по ЗРАСРБ и
допълнителните изисквания на ИМикБ-БАН)

Група от показатели В

**Тема: Бактериални биофилми - развитие, структурно-функционални
характеристики, инхибиране**

Paunova-Krasteva Ts., Haladjova E, Petrov P, Forsys A, Trzebicka B, Topouzova-Hristova T., Stoitsova S. 2020. Destruction of *Pseudomonas aeruginosa* preformed biofilms by cationic polymer micelles bearing silver nanoparticles. *Biofouling*, 36, (6), 679-695.

Abstract: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic Gram-negative pathogen often associated with biofilm infections. This study evaluated the capacity for biofilm destruction of a novel combination of cationic polymer micelles formed from poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)-b-poly(ε-caprolactone)- b-poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) (PDMAEMA-PCL-PDMAEMA) triblock copolymer either alone, or loaded with silver nanoparticles (M_AgNPs). Pre-formed *P. aeruginosa* biofilms were incubated with either blank micelles, AgNO₃, or M_AgNPs. Biofilm biomass (crystal violet assay), metabolic activity (Alamar blue reduction), structure (SEM) and viability (CLSM after Live/Dead staining, or plating for CFU) were checked. The results showed that the micelles alone loosened the biofilm matrix, and caused some alterations in the bacterial surface. AgNO₃ killed the bacteria in situ leaving dead biofilm bacteria on the surface. M_AgNPs combined the two types of activities causing significant biofilm reduction, and alteration and death of biofilm bacteria. Therefore, the applied PDMAEMA-based micelles appear to be a successful candidate for the treatment of *P. aeruginosa* biofilm infections.

Резюме: *Pseudomonas aeruginosa* е опортюнистичен Грам-отрицателен патоген, често свързан с биофилмни инфекции. Това проучване оценява способността за разрушаване на биофилми от новосинтезирани, катионни, полимерни мицели, формирани от поли (2-(диметиламино) етил метакрилат) -b-поли (ε-капролактон) - b-поли (2- (диметиламино)

етил метакрилат) (PDMAEMA -PCL-PDMAEMA) триблоков кополимер ненатоварен, или натоварен със сребърни наночастици (M_AgNPs). Предварително формирани биофилми от *P. aeruginosa*, са инкубирани с ненатоварени мицели, AgNO₃, или M_AgNP. Изследвани са биомасата на биофилмите (чрез кристал-виолетов тест), метаболитната активност (чрез редукция на Alamar blue), структурата (SEM) и жизнеспособността (CLSM след Live/Dead оцветяване или плейтване за CFU). Резултатите показват, че ненатоварените мицели разрехавяват биофилмния матрикс и причиняват някои промени в бактериалната повърхност. In situ изследванията показват, че AgNO₃ убива бактериите, оставяйки мъртви бактерии в биофилм по повърхността. M_AgNPs комбинират два вида активност, причинявайки значителна редукция на биофилма, изменения и смърт на бактериите в биофилма. Приложените PDMAEMA-базирани мицели са успешен кандидат за лечение на биофилмни инфекции от *P. aeruginosa*.

Borisova D., Strateva T., **Paunova-Krasteva Ts.***, Mitov I., Stoitsova S. 2018. Phenotypic investigation of paired *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients prior and post tobramycin treatment. *Comptes rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*, 71 (8), 1044-1051.

Abstract: Cystic fibrosis is a hereditary disease accompanied by extensive secretion of viscous mucins in the digestive and respiratory tracts. Bacterial infections, very often caused by *Pseudomonas aeruginosa*, are the leading cause for exacerbations and early death of patients. One of the comparatively effective to date antibiotics against *P. aeruginosa* is tobramycin. In spite of the initial success of the treatment, however, some part of the bacterial population remains persistent in the lungs. The comparison of paired strains isolated from the same patient prior- and post-antibiotic treatment would elucidate some adaptive mechanisms related with the bacterial persistence in cystic fibrosis, which determined the objectives of the present study. We performed a comparative phenotypic investigation on a panel of 6 couples of paired strains, each couple containing a strain isolated prior- and a strain isolated post-tobramycin treatment from the same patient. We characterized the strains' growth parameters, biofilm formation, and motility (swimming, swarming, and twitching). Strain-to-strain differences were registered with most of the tests. As a distinct trend demonstrated in the examined pairs, the changes in growth parameters should be underlined, and especially the prolongation of the lag phase of the post-treatment strains. This could be an adaptation for persistence.

Резюме: Муковисцидозата е наследствено заболяване, съпроводено с екстензивна секреция на вискозни муцини в храносмилателния и респираторен тракт. Бактериалните инфекции, причинени от *Pseudomonas aeruginosa*, са водещата причина за обостряния и ранна смърт при пациентите. Един от сравнително ефективните, към днешна дата антибиотици срещу *P. aeruginosa* е тобрамицин. Въпреки първоначалния успех на лечението, част от бактериалната популация остава персистентно в белите дробове. Сравнявайки двойки щамове, изолирани от един и същи пациент преди и след антибиотично лечение, би изяснило някои адаптивни механизми, свързани с бактериалната персистенция при муковисцидозата, което определи целите на настоящото проучване. Проведено е сравнително фенотипно изследване на панел от 6 двойки щамове, всяка двойка съдържа, щам изолиран преди и щам изолиран след лечение с тобрамицин от един и същи пациент. Охарактеризирани са растежните параметри на щамовете, биофилм

образуването и подвижността (swimming, swarming, и twitching). При повечето от тестовете са регистрирани щамово специфични разлики. Като отчетлива тенденция, демонстрирана при изследваните двойки щамове, трябва да се подчертае промяната в растежните параметри и особено удължаването на лаг-фазата при пост-третираните щамове. Това би могло да е част от адаптациите за персистенция.

Borisova D., Haladjova E., Kyulavska M., Petrov P., Pispas S., Stoitsova S., **Paunova-Krasteva Ts.*** 2018. Application of cationic polymer micelles for the dispersal of bacterial biofilms. *Engineering in Life Sciences*, (18), 943–948.

Abstract: Contamination of surfaces in hospitals and food industry by bacterial biofilms is a serious health risk. Of concern is their resistance to routine antibacterials and disinfectants. This requires the development of novel approaches to biofilm detachment. The study evaluates the effectiveness of cationic polymer micelles (CPMs) against pre-formed biofilms. CPMs based on different polycations were used. The hydrodynamic radius of the particles ranged from 16 to 360 nm. Biofilms of *Escherichia coli* 420, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Staphylococcus aureus* 29213 and *Bacillus subtilis* 168 were cultivated for 24 h then the pre-formed biofilms were treated with the CPMs for 2, 4 or 6 h. Biofilm biomass was evaluated by the crystal violet assay, and live/dead fluorescence test was applied for bacterial viability. The ability of CPMs to interact with pre-formed biofilms of the model strains was evaluated. We observed that the most effective CPMs were those based on poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) copolymers which reduced the biofilm biomass three- to four-fold compared with the treatment of the biofilm with water. Significantly reduced vitality of the bacteria in the biofilms was registered by the Live/Dead stain. The results indicate the applicability of the CPMs for disinfection of biofilm-contaminated surfaces and the treatment of wounds.

Резюме: Замяръсяването с бактериални биофилми по повърхности, в болниците и хранително-вкусовата промишленост, е сериозен здравен риск. От значение се оказва тяхната устойчивост към стандартните дезинфекциращи и антибактериални средства. Това налага разработването на нови подходи за отстраняване на биофилми. Проучването оценява, ефективността на катионни, полимерни мицели (СРМ) срещу формиран биопилми. Използвани са СРМ, базирани на основата на различни поликатиони. Хидродинамичният радиус на частиците варира от 16 до 360 nm. 24-часови биофилми от *Escherichia coli* 420, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Staphylococcus aureus* 29213 и *Bacillus subtilis* 168 са третирани с СРМ за 2, 4 или 6 часа. Изследвана е биомасата на биофилмите чрез кристал-виолетов тест и Live/Dead флуоресцентен тест за бактериална жизнеспособност. Оценена е способността на СРМ да взаимодействат с формиран биопилми от моделните щамове. Най-ефективните СРМ, които намаляват биофилмната биомаса три до четири пъти в сравнение с третирането на биофилмите с вода са тези, базирани на поли (2- (диметиламино) етил метакрилатни) ко-полимери. Чрез Live/Dead е регистрирана намалена жизнеспособност на бактериите в биофилмите. Резултатите показват приложимостта на СРМ за дезинфекция на замърсени с биофилми повърхности и третиране на рани.

Cullen L, Weiser R, Olszak T, Maldonado RF, Moreira AS, Slachmuylders L, Brackman G, **Paunova-Krasteva Ts**, Zarnowiec P, Czerwonka G, Reilly J, Drevinek P, Kaca W, Melter O, de Soyza A, Perry A, Winstanley C, Stoitsova SR, Lavigne R, Mahenthiralingam E, Sá-Correia I, Coenye T, Drulis-Kawa Z, Augustyniak D, Valvano MA, McClean S. 2015. Phenotypic characterisation of an international *Pseudomonas aeruginosa* reference panel: Strains of cystic fibrosis origin show less in vivo virulence than non-CF strains. *Microbiology (Reading)*. 161 (10):1961-77.

Abstract: *Pseudomonas aeruginosa* causes chronic lung infections in people with cystic fibrosis (CF) and acute opportunistic infections in people without CF. Forty-two *P. aeruginosa* strains from a range of clinical and environmental sources were collated into a single reference strain panel to harmonise research on this diverse opportunistic pathogen. To facilitate further harmonized and comparable research on *P. aeruginosa*, we characterized the panel strains for growth rates, motility, virulence in the *Galleria mellonella* infection model, pyocyanin and alginate production, mucoid phenotype, LPS pattern, biofilm formation, urease activity, and antimicrobial and phage susceptibilities. Phenotypic diversity across the *P. aeruginosa* panel was apparent for all phenotypes examined, agreeing with the marked variability seen in this species. However, except for growth rate, the phenotypic diversity among strains from CF versus non-CF sources was comparable. CF strains were less virulent in the *G. mellonella* model than non-CF strains ($P=0.037$). Transmissible CF strains generally lacked O-antigen, produced less pyocyanin and had low virulence in *G. mellonella*. Furthermore, in the three sets of sequential CF strains, virulence, O-antigen expression and pyocyanin production were higher in the earlier isolate compared to the isolate obtained later in infection. Overall, this full phenotypic characterization of the defined panel of *P. aeruginosa* strains increases our understanding of the virulence and pathogenesis of *P. aeruginosa* and may provide a valuable resource for the testing of novel therapies against this problematic pathogen.

Резюме: *Pseudomonas aeruginosa* причинява хронични, белодробни инфекции при хора с муковисцидоза (CF) и остри опортюнистични инфекции при хора без CF. За да бъдат хармонизирани изследванията върху този разнообразен опортюнистичен патоген, са събрани в един референтен панел, четиридесет и два щамове *P. aeruginosa* от редица клинични и екологични източници. За улеснение на по-нататъшните изследвания върху *P. aeruginosa*, са охарактеризирани темповете на растеж, подвижността, вирулентността при моделна инфекция с *Galleria mellonella*, производството на пиоцианин и алгинат, мукоидния фенотип, LPS модела, биофилм образуването, активността към уреазата, антимикробното действие и чувствителност към фаги, на панелните щамове. Фенотипното разнообразие на *P. aeruginosa* в панела е очевидно при всички изследвани фенотипове, съгласувано със забележима променливост, наблюдавана при този вид. Въпреки това, с изключение на скоростта на растеж, фенотипното разнообразие между щамовете от CF спрямо тези които не са CF, е сравним. CF щамовете са по-малко вирулентни при модела

на *G. mellonella*, отколкото тези, които не са CF (P=0.037). При трансмисивните CF щамове, обикновено липсва O-антигена, те произвеждат по-малко пиоцианин и имат по-ниска вирулентност в *G. mellonella*. Освен това, в три последователни групи CF щамове, вирулентността, експресията на O-антиген и производството на пиоцианин са по-високи при ранния изолат, в сравнение с късния изолат от инфекцията. Тази пълна фенотипна характеристика на панел от щамове *P. aeruginosa* увеличава нашето разбиране за вирулентността и патогенезата при *P. aeruginosa* и може да осигури ценен ресурс за тестване на нови терапии срещу този проблемен патоген.

Vacheva A., Ivanova R., **Paunova-Krasteva Ts.** Stoitsova S., 2012. Released products of pathogenic bacteria stimulate biofilm formation by *Escherichia coli* K-12 strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 102 (1), 105-119.

Abstract: It has recently been shown that pathogens with a limited capacity for sessile growth (like some *Escherichia coli* O157 strains) can benefit from the presence of other bacteria and form mixed biofilms with companion strains. This study addresses the question whether pathogens may influence attached growth of *E. coli* non-pathogenic strains via secreted factors. We compared the biofilm-modulating effects of sterile stationary-phase culture media of a biofilm non-producing strain of *E. coli* O157:H, a laboratory biofilm-producing *E. coli* K-12 strain and a biofilmforming strain of the pathogen *Yersinia enterocolitica* O:3. Sessile growth was monitored as biomass (crystal violet assay), exopolysaccharide (ELLA) and morphology (scanning electron and confocal laser microscopy). With two of the *E. coli* K-12 strains stimulation of biofilm formation by all supernatants was achieved, but only the pathogens' secreted products induced biomass increase in some 'biofilm-deficient' K-12 strains. Lectin-peroxidase labeling indicated changes in colanic acid and poly-N-acetylglucosamine amounts in extracellular matrices. The contribution of indole, protein and polysaccharide to the biofilmmodulating activities of the supernatants was compared. Indole, in concentrations equal to those established in the supernatants, suppressed sessile growth in one K-12 strain. Proteinase K significantly reduced the stimulatory effects of all supernatants, indicating a prominent role of protein/peptide factor(s) in biofilm promotion. The amount of released polysaccharides (rPS) in the supernatants was quantitated then comparable quantities of isolated rPS were applied during biofilm growth. The three rPS had notable strain-specific effects with regard to both the strain-source of the rPS and the *E. coli* K-12 target strain.

Резюме: Наскоро беше доказано, че патогените с ограничени възможности за прикрепен растеж (като някои щамове *Escherichia coli* O157) могат да се възползват от присъствието на други бактерии и да образуват смесени биофилми с тях. Това проучване разглежда въпроса, дали патогени могат да повлияят прикрепения растеж при непатогенни щамове *E. coli*, посредством секретирани фактори. Сравнени са биофилм модулиращите ефекти, на стерилни супернатанти от стационарна фаза, от биофилм непродуциращ щам *E. coli* O157: H, лабораторен щам на *E. coli* K-12, и биофилм формиращ патогенен щам *Yersinia enterocolitica* O:3. Отчетен е растежът като биомаса (чрез кристал-виолетен тест), екзополisahарид (ELLA) и морфология (сканираща електронна и конфокална лазерна микроскопия). При два от щамовете *E. coli* K-12 се наблюдава стимулиране на биофилм

образуването от всички супернатанти, при биофилм неформиращите щамове K-12 секретират от патогените продукти, индуцират увеличаване на биомасата. Белязането с лектин-пероксидаза, показва промени в количествата на коланова киселина и поли-N-ацетилглюкозамин в извънклетъчния матрикс. Сравнена е биофилм модулиращата активност на супернатантите към индол, протеини и полизахариди. Индолът, в концентрации, равни на установените в супернатантите, потиска растежа при един от щамовете K-12. Протеиназа K значително намалява стимулиращият ефект на всички супернатанти, което показва важната роля на белтъчния / пептиден фактор(и) при биофилмите. Отчетено е количеството на полизахаридите (rPS) в супернатантите и е сравнено с това по време на растежа на биофилмите. Трите rPS имат забележими щам специфични ефекти по отношение, както на щамовия източник на rPS, така и на таргетния щам *E. coli* K-12.

Stoitsova S., Ivanova R., **Paunova Ts.**, 2007. Biofilm formation by reference strains of *Escherichia coli*. *Comptes rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*, 60 (1), 71-76.

Abstract: The capacity of 17 strains of *E. coli* (12 of them - uropathogenic, 4 - from other pathotypes, and one non-pathogenic) to form biofilms was examined. The bacteria were cultivated on microtitre plates on minimal glucose medium M63 for 48 h, the attached cells were stained with crystal violet and the absorbance was registered on ELISA reader. Strain to strain differences were observed. Two of the uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains that formed good biofilm were chosen to test the effects of biogenic factors (quorum sensing and epinephrine). Surprisingly, these factors had diverse effects on each of the two strains.

Резюме: Изследвана е способността на 17 щамове *E. coli* (12 от тях - уропатогенни, 4 - от други патотипове и един непатогенен) да формират биофилми. Бактериите са култивирани върху микротитърни плаки в минимална глюкозна среда М63 в продължение на 48 h. Адхезираните клетки са оцветени с кристал виолет и абсорбцията е регистрирана на ELISA ридер. Наблюдавани са щамово специфични различия. Подбрани са два уропатогенни щамове *Escherichia coli* (UPEC), които образуват добър биофилм, с цел тестване на ефектите от биогенните фактори (кворум сенсинг и епинефрин). Изненадващо е, че тези фактори имат различни ефекти върху всеки от двата щамове.

Borisova D., Iordanova V., Stoitsova S., **Paunova-Krasteva Ts.** * 2019. Impact of Growth Conditions on Biofilm Formation by Model Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Strains. *Acta Microbiologica Bulgarica*. 35 (2), 60-65.

Abstract: Present-day medical microbiology faces the risks of biofilm-related infections. These are much more resistant to routinely applied antibacterial preparations, and are often the cause of recurrent infections. The search of novel anti-fouling preparations puts forward the elaboration of a reliable complex approach for selecting and estimating the successful agent. As a first step,

screening procedures should include a fast methodology, and the crystal violet assay is widely applied for semi-quantitative estimation of biofilm biomass. However, the species- and strain-peculiar mechanisms of biofilm formation require optimisation of the experimental protocols with regards to the individual demands of model strains. This study aims to characterise the biofilm-forming behavior of a set of model Gram-positive and Gram-negative strains. The Gram-positive strains included in the experiments were *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Bacillus subtilis* 168. Gram-negative strains were *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and six *Escherichia coli* K-12 strains. The tested variables were growth medium, time of cultivation and growth temperature. Notably, these variables have different, sometimes even opposite effects on planktonic growth and biofilm development. The results provide information needed for the proper design of further screening experiments on these strains, for novel substances with putative anti-biofilm activities.

Резюме: Съвременната медицинска микробиология е изправена пред риска от инфекции, свързани с образуването на биофилми. Биофилмите са много по-резистентни към антибиотици и често са източник на рецидивиращи инфекции. Търсенето на нови анти-биофилмни препарати поставя въпроса за създаването на комплексна методология за селекция и оценка на подходящи вещества. Първите стъпки следва да включват бърза скрининг-методология и тестът "кристал виолет" е един широко прилаган полу-количествен подход за оценка на биофилмната биомаса. Независимо от това, че този тест е широко приет, поради видово- и щамово специфичните механизми на биофилм образуването се налага оптимизиране на експерименталните протоколи с оглед индивидуалните изисквания на моделните щамове. Цел на изследването е, да характеризира биофилм-образуващите характеристики на набор от моделни Грам-положителни и Грам-отрицателни щамове. Включените в изследването Грам-положителни щамове са *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 и *Bacillus subtilis* 168. Грам-отрицателните щамове са *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 и шест щамове *Escherichia coli* K-12. Изследвани са следните вариабилни: растежна среда, продължителност на култивирането и растежна температура. Тези фактори имат различен, понякога - дори противоположен ефект върху развитието на бактериите в течна среда и като биофилм. Резултатите дават възможност за създаване на подходящ експериментален дизайн за осъществяване на скрининг-изследвания върху тази група моделни щамове с включването на нови вещества с очаквана анти-биофилмна активност.

Група от показатели Г

1. Тема: Фенотипни вариации при микроорганизмите– антигенни, повърхностни

Paunova-Krasteva Ts., Georgieva, K., Marhova, M., Borisova, D., Stoitsova, S. 2017. Variability of the surface glycome as an adaptation in host-pathogen interactions. In: H. Najdenski (Ed), Microbiology for a better health and industry, 70-years the Stephan Angeloff Institute of Microbiology, Sofia, ISBN 978-954-92882-2-3, pp. 30-42.

Abstract: The surfaces of cells from all domains of life are characterised by the presence of glycoconjugates (glycoproteins or glycolipids). They are an essential participant in cell-to-cell interactions, including the host-invader interplay. Glycoconjugates represent the major class of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), which is recognised by host pattern-recognition molecules. One large class of pattern recognition molecules is the carbohydrate-binding proteins, or lectins, spread from viruses through all microbe, plant and animal taxa. Lectins with defined sugar specificities are on the other hand a wide-spread tool for the analysis of cellular glycoconjugates. In this review we summarise the experience of our team in characterising the surface glycome of bacteria and helminths by lectinology techniques. In addition we included some reference data on protozoa and nematodes. Concerning bacteria, we noted significant cell-to-cell differences of the density of exposed lectin-binding epitopes between otherwise genetically identical bacteria. Within the bacterial population, the balance between cells with different degree of surface exposure of lectin-binding sites can be shifted dependent on growth conditions, and determines a variable degree of recognition by host lectins. In cestodes, regional variation of lectin binding has been observed along the strobila. Trematodes are characterised by the capacity to vary their surface glycome in relation to the developmental stage. The individual variation in surface sugar composition is correlated of the evolutionarily relevant variability in infectivity and virulence of pathogens in different hosts. Thus, the phenomenon of variation of the surface sugar coating is ubiquitous in pro- and eukaryotic pathogens, which underlines its importance in host-pathogen interactions.

Резюме: Клетъчната повърхност на всички организми се характеризира с наличието на гликоконюгати (гликопротеини и гликолипиди). Те са важен участник в междуклетъчните взаимодействия, вкл. тези между инфекциозните агенти и техните гостоприемници. Гликоконюгатите са основен клас патоген-свързани молекулни структури, които взаимодействат с гостоприемниковите молекули, разпознаващи чужди антигени. Един основен клас разпознаващи молекули са въглехидрат-свързващите протеини – лектини, широко разпространени при вирусите, бактериите и всички таксони растения и животни. От своя страна, много лектини с известна въглехидратна специфичност са включени в методологиите за анализ на клетъчните гликоконюгати. Настоящият обзор обобщава

опита на нашия екип в изследванията на бактерии и хелминти с методи, основаващи се на лектини. Добавили сме и литературни данни за протозои и нематоди. При генетично идентични бактерии установихме големи разлики между индивидуалните клетки по отношение на лектин-свързващите епитопи, достъпни по повърхността. В рамките на бактериалните популации, балансът между различните клетки се променя в зависимост от условията на култивиране, което води и до вариации във възможността на гостоприемниковите лектини да ги разпознаят. При цестоден модел установихме регионални вариации в лектин-свързващите характеристики по дължината на стробилата. При трематодите установихме стадийно-специфични промени в повърхностния гликом. Индивидуалните вариации в състава на повърхностните захари са свързани с еволюционно установени промени в инфективността и вирулентността на патогените в различни гостоприемници. Явлението вариране на повърхностните въглехидрати е повсеместно при про- и еукариотните патогени и това доказва важноста му във взаимоотношенията патоген-гостоприемник.

Lazarkevich I., Sotirova A., Avramova T., Stoitsova S., **Paunova-Krasteva Ts.**, Galabova D., 2015. Antibacterial Activity of Methyltiosulfonate and Its Complexes with Rhamnolipid and Trehalose lipid against *Pseudomonas aeruginosa* NBIMCC 1390. *Research J. of Pharm., Biol. Chem. Sci.* 6 (2), 282-290.

Abstract: The possibility for potentiation of the antibacterial activity of methyltiosulfonate by biosurfactants (rhamnolipid and trehalose lipid) against *Pseudomonas aeruginosa* was studied. The analysis included examination of the changes in growth, morphology, and ultrastructure of bacterial cells. The results demonstrated that the bactericidal effect of methyltiosulfonate was well expressed. It was found that trehalose lipid had no antibacterial activity and no potentiative effect on methyltiosulfonate activity. The combination of methyltiosulfonate and rhamnolipid-biosurfactant had a strong synergistic-like effect. The presence of rhamnolipid - biosurfactant decreased significantly the minimal bactericidal concentration of the antimicrobial agent. Scanning electron microscopy showed considerable changes in the bacterial cell surfaces under the action of methyltiosulfonate alone and the methyltiosulfonate - rhamnolipid combination. Confocal microscopy after Live/Dead staining indicated lack of bacterial killing by rhamnolipid alone, increase of dead cell number after methyltiosulfonate application, and confirmed predominance of dead cells after simultaneous use of the two preparations. It was suggested that the biosurfactant provoked changes in the bacterial membrane organization that increased the access of methyltiosulfonate into the bacterial cell. The enhancement of antibacterial activity of methyltiosulfonate in the presence of biosurfactants significantly increased the therapeutic potential of this compound.

Резюме: Изследвана е способността за засилване на антибактериалната активност на метилтиосулфонат от биосърфактанти (рамнолипид и трехалозен липид) към *Pseudomonas aeruginosa*. Анализът включва изследване на промените в растежа, морфологията и ултраструктурата на бактериалните клетки. Резултатите демонстрират, добре изразен бактерицидният ефект на метилтиосулфонатът. Установено е, че трехалозният липид няма

антибактериална активност и няма потенциален ефект върху метилтиосулфонатната активност. Комбинацията от метилтиосулфонат и рамнолипид-биосърфактант има силен синергичен ефект. Наличието на комбинацията рамнолипид – биосърфактант, понижава значително минималната бактерицидна концентрация на антимикробния агент. Сканиращата електронна микроскопия показва, значителни промени в повърхностите на бактериалните клетки, под действието само на метилтиосулфонат и комбинацията метилтиосулфонат - рамнолипид. Конфокалната микроскопия чрез Live/Dead оцветяване само с рамнолипид, показва липса на бактериално унищожаване само с рамнолипид, увеличаване на броя на мъртвите клетки след приложение на метилтиосулфонат и потвърждава преобладаването на мъртви клетки след едновременна употреба на двата препарата. Предполага се, че биосърфактантът провокира промени в организацията на бактериалната мембрана, които увеличават достъпът на метилтиосулфонат в нея. Повишаването на антибактериалната активност на метилтиосулфонатът в присъствието на биосърфактанти, значително засилва терапевтичния потенциал на това съединение.

Paunova-Krasteva Ts., Pavlova V., DeCastro C., Ivanova R., Molinaro A., Nikolova E., Stoitsova S. 2014. Cyclic enterobacterial common antigens from *Escherichia coli* O157 as microbe-associated molecular patterns. *Canadian Journal of Microbiology*. 60, (3), 173-176.

Abstract: In a previous study, we described 2 forms of cyclic enterobacterial common antigen (ECA_{CYC}), a tetramer and a pentamer, from *Escherichia coli* O157. ECA_{CYC} is present in several representatives of the *Enterobacteriaceae*. To date, functional studies on ECA_{CYC} are sparse. Cyclic oligosaccharides in other bacteria, like the cyclic β -glucans in *Rhizobiaceae*, represent microbe-associated molecular patterns involved in host–bacteria interaction. This observation determined the aim of the present study: to test whether the tetrameric and pentameric ECA_{CYC} from *E. coli* O157 can be recognised by host humoral and cellular mechanisms. ELISA tests designed to compare the 2 ECA_{CYC} with the O157 lipopolysaccharide showed that both ECA_{CYC} were not recognised by polyclonal anti-O157 serum but were good ligands for mannan-binding lectin. The lectin had a higher affinity for the tetramer than the pentamer. ECA_{CYC} deposited more C3b than did the lipopolysaccharide. To examine the interactions with human circulating neutrophils, the antigens were loaded onto fluorescent latex beads and applied in a phagocytosis experiment. Spheres coated with the 2 ECA_{CYC} occasionally adhered to phagocyte surfaces but, unlike O157-loaded spheres, failed to induce free-radical release. The results show that the 2 ECA_{CYC} represent microbe-associated molecular patterns recognised by host humoral non-self-recognition mechanisms.

Резюме: В предишно наше проучване са описани две форми на цикличен ентеробактериален общ антиген (ECA_{CYC}), тетрамер и пентамер, от *Escherichia coli* O157. ECA_{CYC} се срещат при някои представители от сем. Enterobacteriaceae. Към днешна дата функционалните проучвания на ECA_{CYC} са оскъдни. Цикличните олигозахариди при други бактерии, като цикличните β -глюкани при *Rhizobiaceae*, представляват микробно свързани молекулни структури, участващи в гостоприемник - бактериалните взаимодействия. Това наблюдение определи целта на настоящото проучване: да се тества дали тетрамерният и

пентамерен ЕСА_{СУС} от *E. coli* O157 могат да бъдат разпознати от хуморалните и клетъчни механизми на гостоприемника. Разработените ELISA тестове, за сравнение на двата ЕСА_{СУС} с O157 липополизахарида показват, че и двата ЕСА_{СУС} не се разпознават от поликлонален анти-O157 серум, но са добри лиганди за манан-свързващият лектин. Лектинът има по-висок афинитет към тетрамера от пентамера. ЕСА_{СУС} депозира повече С3b, отколкото липополизахарида. За да бъдат изследвани взаимодействията с човешки циркулиращи неутрофили, антигените са натоварени върху флуоресцентни латексови сфери и е приложена фагоцитоза. Сферите, натоварени с двата ЕСА_{СУС}, адхерират към фагоцитната повърхност, за разлика от натоварените с O157, които са неспособни да предизвикат освобождаване на свободните радикали. Резултатите показват, че двата ЕСА_{СУС} представляват микроб-свързани молекулни структури, разпознаваеми от гостоприемниковите хуморални механизми.

Paunova-Krasteva Ts., Stoitsova S., Topouzova-Hristova T., Stephanova E. 2014. *Escherichia coli* O157: effects of growth temperature on concanavalin A binding and the adherence to cultured cells. *Comptes rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*, 67, (3), pp. 349-354.

Abstract: The surface glycoconjugates of bacteria play an important role in the interactions with host cells. This concerns both ligand-receptor recognition and the electrostatic interactions with host glycocalyx. *E. coli* O157 are food-borne pathogens. During the transmission via the environment to the host, the bacteria are subjected to temperature variations. The study focuses on the effects of growth temperatures on the concanavalin A-binding capacity of the bacterial glycocalyx in relation to the adherence of bacteria to cultured cells. It is shown that when bacteria grew at 20°C they had higher affinity for the lectin than cells grown at 37°C, but formed significantly less adherence loci on HeLa cells.

Резюме: Повърхностните гликоконюгати при бактериите, играят важна роля във взаимодействията с гостоприемниковите клетки. Това се отнася, както при разпознаване на ниво лиганд-рецептор, така и при електростатичните взаимодействия с гостоприемниковия гликокаликс. *E. coli* O157 са хранителни патогени. По време на преминаването през околната среда и контакта с гостоприемника, бактериите са подложени на температурни колебания. Изследването се фокусира, върху ефектите на растежните температури върху конканавалин А свързващият капацитет на бактериалния гликокаликс, във връзка с адхезията на бактериите към култивирани клетки. Доказано е, че при култивиране на бактериите при 20°C, те имат по-голям афинитет към лектина, отколкото при 37°C, но образуват значително по-малко адхезионни локуси при HeLa клетки.

Fregolino E., Ivanova R, Molinaro A., Parrilli M., **PaunovaTs.,** Stoitsova S, Cristina De Castro C., 2012. Occurrence and structure of cyclic Enterobacterial Common Antigen in *Escherichia coli* O157: H-. *Carbohydrate Research*. 363, 29-32.

Abstract: Two cyclic forms of the Enterobacterial Common Antigen were isolated from *Escherichia coli* O157:H-. These antigenic determinants were purified from the biomass through extensive chemical, enzymatic and chromatographic procedures whereas MALDI MS spectrometry indicated their cyclic nature with a polymerization degree of 4 or 5. The two species, denoted as ECA_{CYC-4} and ECA_{CYC-5}, were assigned by NMR and showed no further substitution with other appendages such as acetyl groups as usually described for similar cyclic antigens from other Enterobacteriaceae.

Резюме: Изолирани са две циклични форми на ентеробактериален общ антиген от *Escherichia coli* O157: H-. Посредством екстензивни химични, ензимни и хроматографски процедури са пречистени антигенните детерминанти от биомасата. MALDI MS спектрометрията показва тяхната циклична природа със степен на полимеризация 4 или 5. Двата вида, обозначени като ECA_{CYC-4} и ECA_{CYC-5}, са определени чрез NMR и не показват химични субституции с други ацетилови групи, описани при други Enterobacteriaceae.

Stoitsova S., Vacheva A., **Paunova-Krasteva T.**, Ivanova R., Danova S., Manasiev J. 2012. The multicellular behavior of *Escherichia coli*: a target for interferences. In: H. Najdenski (Ed), New Trends in Microbiology, The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, Sofia, ISBN 978-954-92882-1-6, pp. 147-158.

Abstract: Bacteria within a population can communicate using released products and can coordinately shift their phenotypes in response to environmental signals. This report addresses some possibilities to use naturally occurring mechanisms as ways to interfere with two important patterns of multicellular behavior in *E. coli*: biofilm formation and virulence-gene expression. It is shown that released bacterial metabolites (most likely proteins) may be associated with biofilm modulation of *E. coli*. The effects may vary from synergistic (e.g. released products from *E. coli* or *Y. enterocolitica* strains) to antagonistic (well-demonstrated with cell-free spent cultures from 3 strains of *Lactobacillus*). Lactone fractions from the medicinal plant, *A. montana*, could suppress biofilm formation and virulence gene expression. Today, the world-wide application of antibacterials has shown that killing the bacteria creates selection pressures for a rapid evolution of drug resistance. As an alternative, the interferences with the multicellular modes of behavior (like antifouling or suppression of bacterial virulence) may be a promising direction to fight infection.

Резюме: Бактериите в дадена популация комуникират чрез секретирани от тях продукти и могат координирано да променят своя фенотип в отговор на сигнали от обкръжаващата среда. Този доклад разглежда някои възможности за въздействие върху многоклетъчното поведение при *E. coli* (проявяващо се в биофилм образуване или експресия на гени, свързани с вирулентността) чрез механизми, съществуващи в природата. Доказано е, че секретирани метаболитни бактериални продукти (най-вероятно протеини) повлияват биофилм образуването при *E. coli*. Ефектите варират от синергични (напр. продукти, секретирани от *E. coli* и *Y. enterocolitica*) до антагонистични (ясно изразени при приложение на стерилни културални филтрата от 3 щама *Lactobacillus*). Лактон-

съдържащите фнкции от лечебното растение *A. montana* подтискат биофилм образуването и експресията на вирулентни гени. Широкото приложение на антибиотици днес показва, че убиването на бактериите води до селекционен натиск към бърза еволюция на резистентност. Една обещаваща алтернатива за борба с инфекциите е въздействието върху „многоклетъчното” поведение на бактериите (напр. чрез подтискане на биофилм формирането или вирулентността).

Paunova Ts., Ivanova R., Stoitsova S., 2010. Growth temperature-related cell surface changes of *Escherichia coli* O157:H-. *Biotechnol. Biotechnol Equipment.* 24, 585-588.

Abstract: *Escherichia coli* O157 is a foodborne pathogen. We have previously shown that when grown on agar at 37°C but not 20°C it is capable to attach to its surface a glycoconjugate that is reactive with the lectin concanavalin A (ConA) but is poorly recognized by specific antiserum. The aim of the present study is to check whether, and to what extent may such growth-temperature related ConA reactivity interfere with immunoreactivities of the bacterial population and of individual bacterial cells. The results show that there is no strict correlation between ConA reactivity and immunoreactivities of selected single colonies as revealed by immunofluorescence and immunogold for electron microscopy. One important observation was the pronounced cell-to-cell variability regarding access at the surface of immunoreactive sites. This may be due to several factors among which cell-to-cell differences in O157 lipopolysaccharide production dependent on individual cell growth, or differences in amounts of other surface components like the enterobacterial common antigen.

Резюме: *Escherichia coli* O157 е хранителен патоген. Доказано е, че при култивиране върху агар при 37°C, но не и при 20°C, той е в състояние да прикрепя към повърхността си гликоконюгат, който се разпознава от лектина конканавалин А (ConA), но е слабо разпознаваем от специфичен антисерум. Целта на настоящото изследване е да се провери, дали и до каква степен растежната температура има отношение към подобна реакция на ConA, с отношение към имунореактивността на бактериалната популация, както и на отделните бактериални клетки. Резултатите показват, че няма строга корелация между реактивността на ConA и имунореактивността върху избрани единични колонии, както е установено при имунофлуоресценцията и имуно-голда от електронната микроскопия. Важно наблюдение е изразената вариабилност между отделните клетки по отношение на достъпът на имунореактивни сайтове до клетъчната им повърхност. Това може да се дължи на няколко фактора, сред които разлики при продуцирането на O157 липополизахариди, в зависимост от индивидуалния растеж или по отношение на разлики при други повърхностни компоненти като напр. ентеробактериалния общ антиген.

Stoitsova S., **Paunova-Krasteva Ts.**, Borisova D. 2016. Modulation of Biofilm Growth by Sub-Inhibitory Amounts of Antibacterial Substances. In Dharumadurai Dhanasekaran and Nooruddin Thajuddin (Ed.), *Microbial Biofilms - Importance and Applications*, ISBN 978-953-51-2436-8, Publisher: Intech Open. pp. 441-462.

Abstract: It is generally accepted that bacteria in biofilm are more resistant to antibacterials than their planktonic counterparts. For numerous antibiotics, it has been shown that minimal inhibitory concentrations (MICs) for bacteria grown in broth are much lower than the minimal biofilm inhibition concentrations. While sub-inhibitory concentrations, that is, amounts of antibacterials below the MIC, do not either influence or suppress to some extent or other the bacterial growth in liquid media, these same amounts of drugs, natural substances, etc., may have diverse effects on bacterial biofilms, ranging from suppression to stimulation of the sessile growth and varying with regard to the bacterial species and strains. This is a source of additional risks for both biofilm infection of host tissues and contamination indwelling devices. When considering the data for biofilm modulation, differences in experimental protocols should be taken into account, as well as the strain-specific mechanisms of biofilm formation.

Резюме: Бактериите в биофилм са по-устойчиви към антибактериални средства, за разлика от планктонните. За много от антибиотиците е доказано, че минималните инхибиторни концентрации (MIC) при бактериите, култивирани в бульон, са много по-ниски от минималните биофилм инхибиращи концентрации. За разлика от това, суб-инхибиторните концентрации, т.е. количествата антибактериални вещества по-ниски от MIC, не влияят, нито потискат бактериалния растеж в течна среда. Същите тези количества лекарствени препарати, природни продукти и др., могат да имат различни ефекти върху бактериалните биофилми, вариращи от потискане до стимулиране на прикрепения растеж и вариации на видово и шамово специфично ниво. Обобщавайки данните за модулиране на биофилмите, трябва да се вземат предвид различията в експерименталните протоколи, както и специфичните за щама механизми на биофилм образуване.

Paunova-Krasteva Ts., Ivanova R., DeCastro C., Molinaro A., Stoitsova S. 2015. Promotion of the Synthesis of a Concanavalin A-reactive Polysaccharide Upon Growth of *Escherichia coli* O157:H(-) on Solid Medium at 37°C. *Acta Microbiologica Bulgarica.*, 31 (2), 122-126.

Abstract: The polysaccharides exposed at the bacterial surface are involved in many processes related with the interaction of microorganisms with their environments, outside or inside the mammalian host. The aim of this study was to test the effects of growth temperatures (20°C and 37°C) on some characteristics of the surface polysaccharides of *E. coli* O157:H(-). The glycoconjugates were isolated by hot phenol-water extraction. The tests included ELISA, ELLA, immunoelectrophoresis (classical, or modified for application with concanavalin A /ConA/) and Western blot. It was shown that the water-phase fraction of the strain cultivated at 37°C was distinctive among the compared samples. It was poorly recognized by specific anti-*E. coli* O157 antiserum but, contrary to all the other fractions, interacted well with the lectin, ConA. A similar ConA-reactivity was demonstrated for the purified cyclic enterobacterial common antigen (ECA_{CYC}). This implies that the ConA reactivity may likely be due to ECA_{CYC}. The promotion of the release of this ConA-reactive entity at 37°C, i.e., the temperature condition characteristic for host body, indicates its importance in the host-invader interplay.

Резюме: Полизахаридите, локализиращи се по клетъчната повърхност на бактериите, играят роля при множество процеси, свързани с взаимодействието между микроорганизмите и обкръжаващата ги среда, извън или вътре в гостоприемника. Целта на изследването е, да се изясни ефектът на растежната температура (20°C и 37°C) върху някои характеристики на повърхностните полизахариди при *E. coli* O157:H(-). Проведено е изолиране чрез екстракция с воден разтвор на фенол при 60°C. Проведени са ELISA, ELLA, имуноелектрофореза (класическа или модифицирана с конканавалин А /ConA/) и имуноблот тестове. Показано е, че фракцията от водна фаза на щам, култивиран при 37°C, се отличава съществено от останалите проби. Тя се разпознава много слабо от специфичен анти- *E. coli* O157 антисерум, но за разлика от всички останали фракции, се свързва с лектина КонА. Подобна КонА-реактивност се демонстрира и за проба от пречистен цикличен ентеробактериален общ антиген (ЕСА_{СУС4}). Това сочи, че КонА-реактивността на фракцията е възможно да се дължи на ЕСА_{СУС}. Стимулираното освобождаване на КонА-реактивните молекули при 37°C, т.е., температура, характерна за тялото на гостоприемника, сочи тяхната важност при гостоприемник-бактериалните взаимоотношения.

Paunova Ts., Stoitsova S., Ivanova, R., 2010. Application of lectin cytochemistry for differential labelling of surface polysaccharides of pathogenic strains of *Escherichia coli*. *Acta Morphologica et Anthropologica*, 15, 123-127.

Abstract: The study aimed to identify lectins that can differentiate between surface polysaccharide antigens - exopolysaccharide, capsular antigens and lipopolysaccharides of pathogenic strains of *E. coli*. Initially, the isolated antigens - exopolysaccharide, K and O antigens from four *E. coli* serotypes were subjected to dotblot analysis with a panel of four lectins with different sugar specificities. After the selection of differential markers, lectin-gold labelling was performed. Changes in the surface exposure of the antigens as a result of growth temperature and differences between individual cells are described.

Резюме: Изследването има за цел да идентифицира лектини, които могат да разпознават повърхностните полизахаридни антигени - екзополisahариди, капсулни антигени и липополизахариди при патогенни щамове *E. coli*. Първоначално изолираните от четири серотипа на *E. coli* антигени - екзополisahаридни, К и О са подложени на dotblot анализ, чрез панел от четири лектина с различна въглехидратна специфичност. След подбор на подходящи маркери, е проведено лектин-голд белязване. Описани са промените в повърхностната експозиция на антигените, в резултат на растежната температура и разликите между отделните клетки.

Тема: Клетъчни взаимодействия между про- и еукариоти, структурно-функционални изследвания

Ahmedova A., Mihaylova R, Stoykova S, Mihaylova V, **Paunova-Krasteva Ts.**, Mihaylov L, Stoitsova S, Nihtianova D., Momekov G, Momekova D, Yoshizawa M. 2020. Enhanced cellular uptake of platinum by a tetracationic Pt(II) nanocapsule and its implications to cancer treatment. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 155:105545.

Abstract: Despite the known limitations of cisplatin chemotherapy, the treatment of cancer by platinum-based drugs remains the method of choice for many oncologists. The advancement in drug delivery formulations and protocols of combined treatments provided effective tools to ameliorate the side effects of platinum-based therapies. Another approach to improve the pharmacological profiles of anticancer platinum drugs is to properly modify their structure and composition, which has produced numerous platinum complexes with improved therapeutic effect. Recently, we have demonstrated the strong anticancer potency of supramolecular nanocapsules that form by self-assembly of four bis-anthracene ligands with two metal ions, either Pt(II) or Pd(II). Herein, we focus our study on the Pt(II) nanocapsule and its uptake by two types of cancer cells, suspension cultures of HL-60 cells and the adherent cancer cells HT-29. Comparison of the platinum uptake by cancer cells treated with the nanocapsule and with cisplatin evidenced superior uptake of platinum caused by the nanocapsule, which in HT-29 and HL-60 cells prevails by 21 and 31 times, respectively. Morphological changes in the HL-60 cells induced by the Pt(II) nanocapsule were studied by transmission electron microscopy (TEM) which provided plausible explanation of the uptake results. These data corroborate also with the known nanocapsule's very high cytotoxicity, better selectivity, and lack of cross-resistance with cisplatin. Additionally, our estimations of the drug-drug interactions in combined treatments established the propensity of the nanocapsule to exert supra-additive cytotoxicity in combination with cisplatin against the bladder cancer T-24 cells. All these findings define the scope for more detailed pharmacological characterization of the presented Pt(II) nanocapsule.

Резюме: Въпреки известните ограничения на химиотерапията с цисплатин, лечението на рак с лекарства на основата на платина, остава метод на избор от много онколози. Напредъкът във формулировките за лекарствен пренос и протоколите при комбинирани лечения, осигуряват ефективност с цел подобряване на страничните ефекти от терапиите, базирани на платина. Друг подход за подобряване на фармакологичните профили на противораковите, платинени лекарства е правилното модифициране на тяхната структура и състав, което води до множество платинови комплекси с подобрен терапевтичен ефект. Наскоро демонстрирахме, силното противораково действие на супрамолекулни нанокapsули, които се образуват чрез самосглобяване на четири бис-антраценови лиганда с два метални йона, Pt (II) или Pd (II). В това изследване, фокусираме проучването върху нанокapsулата Pt (II) и нейното усвояване от два вида ракови клетки, суспензионни - HL-60 и адхезионни ракови линии HT-29. Сравнявайки навлизането на платина в раковите клетки, третирани с нанокapsулата, и с цисплатина, е отчетено поглъщане на платина от нанокapsулата, което при HT-29 и HL-60 клетките е съответно 21 и 31 пъти. Чрез трансмисионна електронна микроскопия (ТЕМ) са изследвани морфологичните промени в

HL-60 клетките, индуцирани от нанокапсулата Pt (II), даващи правдоподобно обяснение на резултатите от поглъщането. Тези данни се потвърждават и от високата цитотоксичност на нанокапсулата, по-добрата селективност и липсата на кръстосана резистентност с цисплатина. Освен това при направена оценка на лекарствени взаимодействия при комбинирани лечения, се установява склонността на нанокапсулата да упражнява над-адитивна цитотоксичност в комбинация с цисплатина към T-24 ракови клетки от пикочен мехур. Всички тези изследвания, дефинират една детайлна фармакологична характеристика на Pt (II) нанокапсула.

Pavlova V., **Paunova-Krasteva T.**, Stoitsova S., Nikolova E., 2015. Distribution patterns of carbohydrates in murine glycocalyx. *Biotechnol. Biotechnol. Equipment*, 29 (2), 357-362.

Abstract: Enterocytes are unique cells governing an array of processes. They are covered by the gut glycocalyx, which is an extraneous carbohydrate-rich coat and an integral part of the plasma membrane. The intestinal glycocalyx and secreted mucins constitute a glycosylated milieu which has a number of physiological and protective functions. One of the important functions of the glycocalyx is its barrier function against microbial adherence to different membrane glycolipids. Thus, the glycocalyx is an important part of the mucosal immune system in newborns. The aim of our study was to identify the carbohydrates in the small bowel glycocalyx of Balb/c mice at different ages. We used plant lectins with different sugar specificities. Fluorescein-labelled lectins binding different carbohydrate moieties were detected using confocal laser scanning microscopy. Biotinylated lectins were used for transmission electron microscopy observations of the constituents of the gut glycocalyx at different periods of postnatal development in mice. Different carbohydrate moieties that were identified in the murine intestinal glycocalyx followed different distribution patterns and characteristics. Carbohydrates present on the mucus surface depended on tissue localization, cell type and stage of development. The distribution and mucins glycosylation could be of interest in analysing the response of the mucosal barrier to intestinal pathogens causing infection or inflammation.

Резюме: Ентероцитите са уникални клетки, контролиращи редица процеси. Покрити са от чревния гликокаликс, който е богат на въглехидрати и е неразделна част от плазмената мембрана. Чревният гликокаликс и секретираните муцини представляват гликозилирана среда, с редица физиологични и защитни функции. Една от тях е неговата бариерна функция, срещу адхезията на микроорганизми към различни мембранни гликолипиди. Гликокаликсът е важна част от мукозната имунна система при новородени. Целта на нашето проучване е да идентифицираме въглехидратите в гликокаликса на тънките черва, при Balb/c мишки от различни възрастови групи. Приложени са растителни лектини с различни въглехидратна специфичност. Чрез конфокална лазерна сканираща микроскопия с флуоресцентно белязани лектини са разпознати, различни въглехидратни участъци. Използвайки биотинилирани лектини, са проведени електронно-микроскопски изследвания, на чревния гликокаликс през различни периоди от постнаталното развитие на мишки. Различните въглехидратни участъци, които са идентифицирани в миши чревен гликокаликс, следват различни модели на разпределение и характеристики. Наличието на въглехидрати по мукозната повърхност, зависи от локализацията на тъканите, типа на

клетките и етапите от развитие. Разпределението и гликозилирането на муцини, представлява интерес при анализ на реакции на лигавичната бариера към чревни патогени, причиняващи инфекция или възпаление.

Abrashev R., Stoitsova S., Krumova E., Pashova S., **Paunova-Krasteva Ts.**, Vassilev S., Dolashka-Angelova P., Angelova M., 2014. Temperature-stress tolerance of the fungal strain *Aspergillus niger* 26: physiological and ultrastructural changes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, (5), 1661-1668.

Abstract: The study focuses on the morphological and physiological cell responses to oxidative stress induced by high temperature treatment in the industrially relevant fungus *Aspergillus niger* 26. Temperatures above 30°C lead to growth suppression and changes in morphological characteristics: decrease in the size of hyphal elements and increase in “active length” by switching from slightly branched long filaments to a multitude of branched forms containing active cytoplasm. Transmission electron microscopy of fungal cultures heated at 40°C demonstrated abnormal wavy septation with reduced amount of chitin (as shown by WGA-gold labelling), intrahyphal hyphae development, disintegration of mitochondria and extensive autolysis. Temperature-dependent decrease in the total intracellular protein content and a sharp increase (six to tenfold) in oxidatively damaged proteins were also demonstrated. Elevated temperatures caused a two and threefold increase in catalase and superoxide dismutase activities, respectively.

Резюме: Изследването е фокусирано, върху морфологичните и физиологични клетъчни отговори на оксидативния стрес, предизвикан от високотемпературно третиране на индустриално значимата гъба *Aspergillus niger* 26. Температурите над 30°C водят до потискане на растежа и промени в морфологичните характеристики: намаляване на размера на хифалните елементи и увеличаване на дължината, чрез преминаване от леко разклонени дълги нишки към множество разклонени форми, съдържащи активна цитоплазма. Трансмисионно-електронната микроскопия на култури, загряти при 40°C, демонстрира необичайно септиране с намалено количество на хитин (както е показано при WGA-голд белязането), развитие на интрахифални хифи, дезинтеграция на митохондриите и екстензивна автолиза. Демонстрирано е и температурно зависимо намаляване на общото вътреклетъчно съдържание на протеин и рязко увеличаване (шест до десет пъти) на окислителните протеини. Завишените температури, причиняват двукратно и трикратно повишаване на каталазата и супероксиддисмутазата.

Topouzova-Hristova T., Stoitsova S., **Paunova-Krasteva Ts.**, Doumanov J., Stephanova E. 2013. Changes in the actin cytoskeleton and actin-associated proteins in HeLa cells as a result of *E. coli* O157:H7 infections. *Bul. J. of Agricul. Sciences.* 19 (2), p. 155-158.

Abstract: *Escherichia coli* strains with the O157 LPS serotype may cause health disorders with variable severity. These bacteria are extracellular pathogens, which have developed a specific mode to manipulate host cell cytoskeleton by means of a Type III secretion system. On the background of the very well analyzed F-actin rearrangements, little is known about the possible interference of *E. coli* O157 adherence with other cytoskeleton-related proteins and events in non-polarized host cells. Here we describe data indicating alterations of the actin-associated proteins ZO-1 and villin during co-incubation of HeLa cells with a strain of *E. coli* O157:H7. Using laser scanning confocal microscopy our data demonstrate unusual cytoskeletal actin rearrangement in HeLa cell line comparing to polarized epithelial cells. Additionally, behavior of actin-associated proteins ZO-1 and villin, as well as lack of F-actin patches, suggested a different manner of bacterial pathogenesis in non-polarized epithelial cells.

Резюме: *Escherichia coli* щамове с O157 LPS серотип, могат да причинят здравни проблеми с различна тежест. Посредством тип III секреторна система, тези извънклетъчни патогени, използват специфичен механизъм за манипулиране на гостоприемниковият цитоскелет. На фона на съществуващите сведения за пренареждане на F-актин, малко се знае за възможната интерференция на адхезията при *E. coli* O157, с други свързани с цитоскелета протеини и промени при неполяризираните гостоприемникови клетки. Тук описваме данни, показващи промените в актин-свързаните протеини ZO-1 и вилин по време на ко-инкубация на HeLa клетки с *E. coli* O157:H7. Използвайки лазерна сканираща конфокална микроскопия, нашите данни показват необичайно пренареждане на актиновия цитоскелет при HeLa клетъчната линия, в сравнение с поляризираните епителни клетки. Освен това поведението на актин-свързаните протеини ZO-1 и вилин, както и липсата на F-актин, предполагат различна бактериална патогенеза при неполяризираните епителни клетки.

Krumova E., Stoitsova T., **Paunova Ts.**, Pashova S., Angelova M., 2012. Copper stress and filamentous fungus *Humicola Lutea* 103: Ultrastructural changes and activities of key metabolic enzymes. *Canadian Journal of Microbiology* 58, (12), 1335-1343.

Abstract: *Humicola lutea* 103 is a copper-tolerant fungal strain able to grow in the presence of $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ under submerged cultivation. To prevent the consequences of copper overload, microorganisms have evolved molecular mechanisms that regulate its uptake, intracellular traffic, storage, and efflux. In spite of this avoidance strategy, high heavy-metal concentrations caused distinct and widespread ultrastructural alterations in *H. lutea*. The mitochondria were the first and main target of the toxic action. The effect of copper on activities of the key enzymes (hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, malate dehydrogenase, and isocitrate dehydrogenase) included in the 3 main metabolic pathways, glycolysis, pentose phosphate pathway, and tricarboxylic acid cycle, was investigated. High metal concentrations exhibited a dramatic negative effect on hexokinase, while the other 3 enzymes showed a significant and dose-dependent stimulation. On the basis of the present and previous results we concluded that the copper-induced oxidative stress plays an important role in the fungal tolerance to high Cu^{2+} concentrations.

Резюме: *Humicola lutea* 103 е мед толерантен шам, способен да расте в присъствието на $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ при култивиране. Микроорганизмите са разработили молекулярни механизми, за да предотвратят последствията от претоварване с мед, като така регулират поемането, вътреклетъчния трафик, съхранението и отделянето. Въпреки тази стратегия за избягване на високите концентрации, тежките метали причиняват отчетливи и широко разпространени ултраструктурни промени при *H. lutea*. Митохондриите са първата и основна цел на токсичното действие. Изследван е ефектът на медта върху активността на ключовите ензими (хексокиназа, глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа, малат дехидрогеназа и изоцитрат дехидрогеназа), включени в 3-те основни метаболитни пътища, гликолиза, пентозо-фосфатен път и цикъла на трикарбоксилната киселина. Високите метални концентрации, показват драматичен, отрицателен ефект върху хексокиназата, докато останалите 3 ензима показват значителна и дозо зависима стимулация. Въз основа на настоящите и предишни резултати заключението е, че мед индуцирания оксидативен стрес играе важна роля в поносимостта на гъбите към високи концентрации на Cu^{2+} .

Alexieva B., Stoitsova S., Pavlova V., **Paunova Ts.**, Nikolova E., 2009. Whey protein concentrate as a protective agent against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Biotechnol. Biotechnol. Eq.*, 23, 493-497.

Abstract: Whey proteins are considered as functional food ingredients which have high cysteine content and promote the biosynthesis of glutathione– the primary intracellular antioxidant. Doxorubicin (DOX) is one of the most active antitumor antibiotics in current use. The therapeutic value of DOX, however, is limited by its toxicity. Oxidative stress is one of the underlying mechanisms of DOX toxicity in noncancerous (nontargeted) tissues. We investigated the protective effect of whey protein concentrate against DOX toxicity and oxidative stress. The administration of DOX (20 mg/kg i.p.) to BALB/c mice caused significant decrease of tissue glutathione level in the heart and severe histopathological changes, examined by light and transmission electron microscopy. These biochemical and histological alterations were effectively attenuated on pretreatment with whey protein concentrate. We therefore concluded that the protective action of whey is due to the enhancement of tissue glutathione level which might have important cytoprotective effects on oxidative stress, induced by DOX treatment.

Резюме: Суроватъчните протеини се считат за функционални хранителни съставки, които имат високо съдържание на цистеин и подпомагат биосинтезата на глутатион - основният вътреклетъчен антиоксидант. Доксорубицина (DOX) е един от най-активните антитуморни антибиотици в момента. Терапевтичната стойност на DOX, обаче е ограничена от неговата токсичност. Оксидативният стрес е един от основните механизми на DOX токсичност в неракови (нетаргетни) тъкани. Изследван е протективния ефект на концентрат от суроватъчен протеин, към DOX токсичността и оксидативния стрес. При прилагане на (20 mg / kg i. p.) DOX на мишки BALB / c се установява значително намаляване на нивото на глутатион в сърцето и тежки хистопатологични промени.

Изследванията са проведени чрез светлинна и трансмисионна електронна микроскопия. Тези биохимични и хистологични промени ефективно намаляват, чрез предварителна обработка с концентрат от суроватъчен протеин. В заключение, защитното действие на суроватката се дължи на повишаване на нивото на глутатион в тъканите, което може да има важни цитопротективни ефекти върху оксидативния стрес, предизвикано от DOX лечението.

Stoitsova, S., **Paunova, T.**, Spasova, B. 2006. Localization of chitin in the cell wall of *Aspergillus niger* 26 and its changes in the course of hyphal differentiation. *Comptes rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*, 59, 955-958.

Abstract: The localization of chitin in *Aspergillus niger* is studied by cytochemistry using WGA-gold labelling. In young hyphae, the label occurs in outgrowing tips and in hyphal cell-wall septa. In hyphae with large vacuoles and electron-dense areas in the cytoplasm, intense WGA-binding on side walls also occurs. Where autolysis develops the cell wall appears stratified, and chitin is localized only in its external layers.

Резюме: Проведено е цитохимично изследване на локализацията на хитин в *Aspergillus niger* чрез WGA-голд белязане. При младите хифи, белязането е в нарастващите върхни участъци и в септите на хифите. Срещат се и хифи с големи вакуоли и електронно-плътни участъци в цитоплазмата, наблюдава се интензивно WGA-белязане на клетъчните стени. Там, където се развива автолиза, клетъчната стена изглежда стратифицирана и хитинът е локализиран само във външните слоеве.

Stoitsova S., **Paunova-Krasteva Ts.**, Pavlova V., Nikolova E. 2014. Stimulated gut differentiation and the risks of bacterial infections. *Comptes rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*, 67, (2), pp. 211-216.

Abstract: Neonatal gut differentiation is driven by a variety of mechanisms among which nutrition. Gut development, regarding both the epithelial cells and the glycocalyx, goes in parallel with bacterial colonization. Feeding ensures a balance of these two processes. Numerous formulas of artificial foods are being developed. One important question is can the inclusion of one type of supplements or another in these formulas influence bacterial colonization and/or the susceptibility to infections. The aim of the study was to test the effect of growth factors on the in vitro adherence of *E. coli* strains to gut explants. Gut explants from 5-day newborn mice were incubated for 24 h in the presence of EGF, FGF alpha and beta, SCF and TNF alpha prior to co-cultivation with 3H-thymidine labelled bacteria. The *E. coli* strains included (O1:K1, O7:K1 and O25) are often related with infections of premature neonates. Two of the strains contain K1 capsule composed of sialic acid, a common sugar of human tissues, and if they cross the gut barrier they cannot be identified as non-self. The results showed that stimulation of the gut

explants with the fibroblast growth factors increased significantly the adhesion of the bacteria. Therefore they are not recommendable as supplement for artificial neonate food formulas.

Резюме: Диференциацията на червата при новородените се задвижва от различни механизми, сред които е и храненето. Развитието на червата, както по отношение на епителните клетки, така и на гликокаликса, върви паралелно с бактериалната колонизация. Храненето осигурява баланс на тези два процеса. Разработват се множество формули за изкуствени храни. Важният въпрос е, дали включването на един или друг вид добавки към тези формули, може да повлияе бактериалната колонизация и/или податливостта към инфекции. Целта на проучването, е да бъде тестван ефектът на растежните фактори върху *in vitro* адхезията на щамове *E. coli* към чревни експланти. Чревни експланти от 5-дневни новородени мишки, са инкубирани в продължение на 24 часа в присъствието на EGF, FGF алфа и бета, SCF и TNF алфа, преди ко-култивиране с 3H-тимидин белязани бактерии. Щамовете *E. coli* (O1:K1, O7:K1 и O25) често се свързват с инфекции при недоносени новородени. За два от щамовете е известно, че притежават K1 капсула, която е съставена от сиалова киселина, често срещана захар при човешките тъкани, така че при преминаване през чревната бариера, те биват неразпознаваеми. Резултатите показват, че при стимулиране на чревните експланти с фибробластни растежни фактори, се повишава значително адхезията на бактериите. Следователно, не е препоръчително да се използват, като изкуствени добавки в храни за новородени.

Paunova-Krasteva Ts., Velkova V., Borisova D., Stoitsova S. 2017. Intracellular survival of PAO1 in A549 cells. *Annuaire de l, Universite de Sofia "St. Kliment Ohridski", Faculty of Biology* 2017; 102; 4; p. 170-175.

Abstract: In their interaction with host epithelia, different strains of *Pseudomonas aeruginosa* manifest different phenotypes: they may remain adherent to the surface of the eukaryotic cells (adherent phenotype), or penetrate and survive intracellularly (invasive phenotype). The aim of the study is to characterize the interaction of strain *P. aeruginosa* PAO1 with human lung carcinoma A549 cells. Initially, we performed a co-cultivation of the cells with 1×10^4 bacteria for 2 hours followed by incubations for 1 or 24 hours of the infected cells in the absence of bacteria. We determined the number of viable intracellular bacteria by plating on agar. The result indicated that the bacterium is capable for intracellular replication. Using a three-parental labelling system (including *E. coli* MT 102 pBAN 8 as donor, and *E. coli* HB 101 pR K600 as helper) the strain was labelled with green fluorescent protein. Fluorescent microscopy of the GFP-carrying PAO1-GFP strain after co-cultivation with A549 cells confirmed the intracellular survival of the bacteria, as well as progressive disruption of the actin cytoskeleton.

Резюме: При взаимодействието си с гостоприемниковия епител, различните щамове *Pseudomonas aeruginosa*, проявяват различни фенотипове: те могат да адхезират към повърхността на еукариотните клетки (адхезивен фенотип) или да навлязат и да оцелят вътреклетъчно (инвазивен фенотип). Целта на изследването е, да се проследи

взаимодействието на щам *P. aeruginosa* PAO1 с човешка белодробна карциномна клетъчна линия A549. Проведено е ко-култивиране на клетките с бактерии в концентрация 1×10^4 в продължение на 2 часа и последващо инкубиране за 1 или 24 часа на заразените клетки без наличие на бактерии. Определен е броят на жизнеспособните, вътреклетъчни бактерии чрез посев върху агар. Резултатите показват, способността на бактериите за вътреклетъчна репликация. Прилагайки три-парентална система (включваща *E. coli* MT 102 рВАН 8 като донор и *E. coli* HB 101 рR K600 като хелпер) е белязан щам *P. aeruginosa* PAO1 със зелен флуоресцентен протеин. При ко-култивиране на клетки A549 с GFP-белязаният щам (PAO1-GFP), чрез флуоресцентна микроскопия, се потвърждава вътреклетъчното оцеляване на бактериите, както и прогресивното разрушаване на актиновия цитоскелет.

Pavlova, V., Georgieva, L., **Paunova, Ts.**, Stoitsova, S., Nikolova, E., 2013. Carbohydrate localization in intestinal glycocalyx. *Science and Technologies*. 3 (1), 17–21.

Abstract: The intestinal glycocalyx constitutes a glycosylated milieu, reactive with gut microflora and protects the gut from intestinal infections. The contents of the glycocalyx layer are in dynamic balance between biosynthesis of new glycans and removal of existing constituents. The fine structure of the glycocalyx was recently revealed to some extent. The aim of our work was to study the structure and localization of the components of intestinal glycocalyx in mice. For that purpose we used lectins labeled with fluorescent dye or with biotin (*Lotus tetragonolobus*, *Ulex europaeus*, *Triticum vulgare*). We used fluorescent and transmission electron microscopy to trace the localization of N-acetyl- β -glucosamine oligomers and of α -L-fucosyl residues on the microvillus glycocalyx. N-acetyl- β -glucosamine oligomers were abundant in all microvillus surfaces. α -L-fucosyl residues were not detectable in the glycocalyx of duodenum, jejunum or ileum of adult mice by fluorescent microscopy but localized using the confocal state of art technique.

Резюме: Чревният гликокаликс представлява гликозилирана среда, реагираща с чревната микрофлора, която предпазва червата от инфекции. Съдържанието на гликокаликсния слой е в динамичен баланс между биосинтеза на нови гликани и отстраняване на съществуващите. Наскоро беше разкрита до известна степен, финната структура на гликокаликса. Целта на нашата разработка е да проучим структурата и локализацията на компонентите на чревния гликокаликс при мишки. За целта са използвани лектини, маркирани с флуоресцентни багрила или с биотин (*Lotus tetragonolobus*, *Ulex europaeus*, *Triticum vulgare*). За да проследим локализацията на N-ацетил- β -глюкозаминовите олигомери и α -L-фукозните остатъци върху микровилусния гликокаликс, са приложени флуоресцентна и трансмисионна електронна микроскопия. N-ацетил- β -глюкозаминовите олигомери са в изобилие по повърхността на микровилите. Чрез флуоресцентна микроскопия, α -L-фукозни остатъци не са открити в гликокаликса на дванадесетопръстника, йеюнума или илеума на възрастни мишки, но чрез конфокална микроскопия се установява локализация.

Topouzova-Hristova T., Atanasova B., Strateva T., **Paunova-Krasteva Ts.**, Stephanova E., Mitov I., Stoitsova S. 2013. Comparative study of the cytotoxic effects of the two *P. aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *Science and Technologies*. 3, (1), 1-4.

Abstract: The study addresses the cytotoxic effects of co-cultivation of lung epithelial cells A549 with two clinical strains of *P. aeruginosa* isolated from the same patient with cystic fibrosis pre- (Pa48) and post-tobramycin (Pa64) inhalatory treatment. We examined the effects of 2 h co-cultivation of the lung cells with 10⁵ bacteria/ml by applying the trypan blue exclusion test. The results show a high in vitro cytotoxic effect of the two strains if compared with the widely studied strain PAO1. They differ in the mode of action. While trypan blue penetration is over the whole area of the A549 monolayer co-cultivated with strain Pa48, both strains Pa64 and PAO1 affect individual loci of neighboring cells leaving other areas of the monolayer apparently intact.

Резюме: Изследването разглежда цитотоксичните ефекти при ко-култивиране на белодробни епителни клетки А549 с два клинични щама *P. aeruginosa*, изолирани от един и същи пациент с муковисцидоза, преди (Pa48) и след инхалаторно лечение с тобрамицин (Pa64). Чрез прилагане на тест с трипаново синьо, изследвахме ефектите след 2 ч. ко-култивиране на белодробните клетки с 10⁵ бактерии/мл. Резултатите показват висок *in vitro* цитотоксичен ефект на двата щама, при сравнение с щам PAO1. Те се различават по начина на действие. Докато при ко-култивиране с щам Pa48, проникването на трипановото синьо е по цялата повърхност на А549 монослоя, при двата щама Pa64 и PAO1 се откриват отделни локуси на съседни клетки, оставяйки области от монослоя сравнително интактни.

Topouzova-Hristova T., Stoitsova S., **Paunova-Krusteva Ts.**, Stephanova E. 2012. Interaction of two strains of *Escherichia coli* O157 with human epithelial cells. *Science and Technologies*. 2, (1), 47-50.

Abstract: *Escherichia coli* strains with the O157 LPS serotype are often related with foodborne infections. These bacteria are extracellular pathogens which have developed a specific mode to manipulate host cell cytoskeleton using a Type III secretion system by which they modify host microvilli and form specific attaching-and-efacing lesions. *E. coli* O157 strains of different origin and H serotype have been previously shown to vary in their interaction patterns with cultured cells. Adherent bacteria form compact structures known as localized adherence (LA) loci, or are more diffuse in a localized adherence-like (LAL) pattern. Here we compare the adhesion patterns characteristic for one *E. coli* O157:H- and one *E. coli* O157:H7 strain.

Резюме: Щамовете *Escherichia coli* със серотип O157 LPS често се свързват с хранителни инфекции. Тези бактерии са извънклетъчни патогени, които са разработили специфичен начин да манипулират гостоприемниковия цитоскелет, използвайки тип III секреторна система, чрез която те модифицират гостоприемниковите микровили и образуват А/Е

лезии. Доказано е, че щамове *E. coli* O157 с различен H серотип имат различен модел на взаимодействие с култивирани клетки. Адхезираните бактерии образуват компактни структури, известни като локуси на локализирана адхезия (LA), или са по-дифузни в локализирано подобен модел на адхезия (LAL). Сравнени са моделите на адхезия, характерни за щамове *E. coli* O157: H- и *E. coli* O157: H7.

Paunova-Krasteva T., Pavlova V., Nikolova E., Ivanova R., Stoitsova S., 2011. Phagocytosis of *E. coli* polysaccharide antigen-coated fluorescent spheres by human neutrophils. In: Youth Scientific Conference 'Kliment's Days, 22-23 Nov, Faculty of Biology, Sofia University, Conference Proceedings Second Book, p. 57-60.

Abstract: The aim of the study was to elaborate a model system capable to differentiate the role of different types of polysaccharides in the interaction with neutrophils. Four polysaccharide antigens were included in the study (lipopolysaccharides O157 and O6, capsular K2 antigen and enterobacterial common antigen ECA). We designed a model of bacterial cells covered with only one antigen by non-covalently conjugating FITC-labeled latex spheres with a single type of polysaccharide. These spheres were applied in a phagocytosis test by human neutrophils. Phagocytosis was performed for 30 min. The results were analysed by flow cytometry and confocal laser scanning microscopy (CLSM). The results confirm increase of FITC-labeled spheres in samples loaded with the O157 and O6 antigens. CLSM confirmed internalization of these spheres while those loaded with K2 and ECA were predominantly superficially located on the neutrophils. These results show that the model system of antigen-loaded latex spheres is applicable for comparative studies of the role of different polysaccharide antigens in the interactions with the host phagocyte system.

Резюме: Целта на изследването е да бъде разработена моделна система, разграничаваща ролята на различните видове полизахариди при взаимодействие с неутрофилите. В проучването са включени четири полизахаридни антигена (липополизахариден O157 и O6, капсулен K2 и ентеробактериален общ антиген ECA). Проектирали сме модел на бактериални клетки, натоварени само с един антиген, чрез нековалентно конюгиране на FITC белязани латексови сфери с единичен тип полизахарид. Сферите са подложени на фагоцитозен тест от човешки неутрофили. Фагоцитозата е проведена в продължение на 30 минути. Резултатите са анализирани чрез флоуцитометрия и конфокално-лазерна сканираща микроскопия (CLSM). Получените резултати потвърждават, увеличаване на FITC белязаните сфери при пробите с O157 и O6 антигените. CLSM доказва интернализацията на тези сфери, за разлика от тези заредени с K2 и ECA които са предимно повърхностно разположени върху неутрофилите. Тези резултати показват, че моделната система за антиген белязани латексови сфери, е приложим метод при сравнителни изследвания за определяне ролята на различните полизахаридни антигени, при взаимодействието им с фагоцитната система на гостоприемника.