РЕЗЮМЕТА НА ОСНОВНИТЕ РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ПРИНОСИ на гл. ас. д-р инж. Цветелина Георгиева Фотева, представени за участие в конкурс за „доцент“ по научна специалност 5.11. Биотехнологии (Технология на биологично активните вещества), обявен от ХТМУ в ДВ, брой 96/17.11.2023 г.

Справката за научните приноси е направена въз основа на представените за участие в конкурса за академична длъжност „доцент“ 37 публикации, от които 29 са в списания реферирани в световните бази данни Web of Science и Scopus с импакт фактор или SJR, а 8 са в нереферирани списания с научно рецензиране или в редактирани колективни томове от конференции. В допълнение, в конкурса кандидатката участва със забелязани над 100 цитата, извън тези за придобиване на научна степен „доктор“. Научните разработки са представени под формата на 40 постерни съобщения и 1 устен доклад на национални и международни конференции.

Гл. ас. Фотева е участвала активно в изпълнението на 19 проекта, 4 от които към ФНИ. Била е ръководител и на 5 договора към НИС-ХТМУ. Тези научни показатели са постигнати при средно годишно учебно натоварване (за последни 4 учебни години) над 600 часа. Под нейно ръководство са изработени и защитени 13 дипломни работи, от които 10 за ОКС „бакалавър“ и 3 за ОКС „магистър“. Също така, е била консултант на 7 дипломанта.

Научните приноси са групирани в следните тематични направления:

1. **Антимикробна активност на полимерни материали, съдържащи метални йони.**
2. **Биосъвместимост и цитотоксичност на хибридни материали.**
3. **Синтез, охарактеризиране, анализ и изследване на активност на биомолекули с цел приложението им в медицината, фармацията и диагностиката.**

1. Антимикробна активност на полимерни материали, съдържащи метални йони

В последните години се наблюдава повишен интерес към инкорпорирането на метални наночастици в различни хибридни полимерни матрици с цел стабилизиране на наноструктурите и получаване на материали, обединяващи свойствата на хибрида и наночастиците. Това ги прави интересен кандидат за приложение както в *in vivo*, така и в *in*

vitro биомедицински изследвания и в биотехнологията. Включването на метални наночастици в хибридни материали позволява формирането на устойчиви вещества, притежаващи антибактериални и антифунгистични свойства и употребата им както като антимикробни средства срещу силно патогенни и лекарствено-резистентни микроорганизми, така и като преносители на лекарства, в образната диагностика, в регенерирането на тъкани, в изкуствени импланти и др.

В сравнение с органичните антибактериални материали, неорганично-органичните хибриди притежават редица предимства като механична здравина, химическа стабилност, термична устойчивост и имат сравнително малко странични ефекти за човека. Хибридните полимерни материали осигуряват стабилизиране на металните наночастици, снижаващо риска от бързо освобождаване на активния агент и удължаване на ефекта на тези материали, като ги прави приложими в съвременната биомедицина.

Получени са три типа неорганично-органични хибридни материали на основата на силициев диоксид, хидроксипропил целулоза (HPC), хидроксипропил метилцелулоза (HPMC), карбоксиметил целулоза (CMC) и включени сребърни наночастици (AgNPs) по зол-гелен метод. Структурата и повърхностната морфология на получените материали е охарактеризирана посредством инфрачервена спектроскопия, атомно-силова микроскопия, сканираща електронна микроскопия (SEM), трансмисионна електронна микроскопия (TEM) и Brunauer–Emmett–Teller (BET) анализи (**I.1, I.2**). Съдържанието на сребро в материалите варира от 0 до 2.5 wt. %, водещо до промяна в повърхностната морфология от гладка до грапава с увеличаване на съдържанието на сребро. Сребърните наночастици равномерно са разпределени в материалите, наблюдават се сферични частици с размер 10-50 nm, а най-високата концентрация - 2.5 wt. % води до агрегация на частиците (**I.1**). Малкият размер на частиците, както и неправилната форма са от съществено значение по-лесното проникване през цитоплазмената мембрана и следователно за по-доброто антибактериално действие. Според направените UV–Vis анализи среброто присъства в материалите под форма както на Ag^+ така и на наночастици (**I.2**). Изследвани са антимикробните свойства на хибридните материали спрямо прокариотни и еукариотни микроорганизми. Микроорганизмите, които са използвани, са тест култури или наричани още контролни щамове, предоставени от Националната банка за

промишлени микроорганизми и клетъчни култури (НБПМКК) и служат за оценка антимикробната ефективност на синтезираните хибридни материали.

Като тест култури за Грам-отрицателни и Грам-положителни бактерии бяха използвани съответно *Escherichia coli* K12 и *Bacillus subtilis* 3562. Получените резултати показват дозо-зависим ефект на микробна чувствителност по отношение на използваното количество сребро. *B. subtilis* 3562 се определя като по-чувствителен щам спрямо въздействието на материалите в сравнение с *E. coli* K12 (**I.1, I.2**). Използвани са и клинични щамове *Pseudomonas aeruginosa* за оценка антимикробния характер на изследваните хибридни материали **(III.2)**. Като тест-култури за еукариотни микроорганизми са използвани дрожди *Saccharomyces cerevisiae* 537 (**II.1**) и *Candida albicans* 74 (**I.4**). Растежът на клетките и на двата щама се редуцира значително в присъствие на хибридните материали с високо съдържание на сребро. Наблюдава се морфологичен диморфизъм на клетките на *C. albicans* 74 в присъствие на материали, съдържащи сребро. Той се изразява в преход на клетките от патогенна – мицелна форма в апатогенна – дрождева форма. В заключение изследваните материалите могат да се използват в биомедицината за превенция на гъбични заболявания (**I.4**).

Проведени са анализи, фокусирани върху изследване антимикотичния ефект на материалите спрямо *Aspergillus niger* 371 (**III.3**). Въз основа на проведените експерименти е установена по-силно изразена чувствителност на *Penicillium chrysogenum* 2303 спрямо тестваните хибридни материали в сравнение с *Asp. niger* 371. Хибридите потискат растежа на плесените само в първоначалните етапи на култивиране, след което в по-късен етап се отчита невъзможност на материалите да окажат пълно инхибиране на щамовете. Поради тази причина ефектът, който хибридните материали оказват върху изследваните еталонни щамове плесени, може да бъде определен като фунгистатичен. Установено бе, че материалите с високо съдържание на сребро (2 wt. % и 2.5 wt. % Ag) повлияват процеса на спорулиране, което е предпоставка за потенциално приложение като покрития.

Получени са и сферични сребърни наночастици, включени в порьозни колагенови структури чрез метод на редукция с участие на микровълни. Амонякът и етанолът играят важна роля в редуцирането на сребърните йони до AgNPs. Извършени са UV-Vis и TEM анализи за потвърждаване наличието и размерите на наночастиците. Оценени са бактерицидните свойства на структурите срещу *B. subtilis* NBIMCC 3562 и *E. coli* K12

NBIMCC 407 и в заключение може да се каже, че те могат да намерят медицински приложения като антибактериални импланти **(II.11).**

Наред с получените хибридни материали, базирани на SiO_2, различни целулозни деривати и сребърни наночастици, по зол гелния метод са синтезирани и такива, съдържащи други антимикробни агенти като цинкови наночастици. Проучена е морфологията им посредством UV-Vis, TEM, DTA/TG анализ, както и техните антибактериални и антигъбични свойства спрямо референтни щамове *B. subtilis* NBIMCC 3562 и *E. coli* K12 **(II.3),** *Candida albicans* 74 **(III.6)** и клинични щамове *Salmonella* и *Shigella* **(III.8)**, *Klebsiella* **(III.7).** Антимикробната активност на материалите е изпитана по отношение на плесени *Asp. niger* 371 и *P. chrysogenum* 2303, при което се доказа добър антимикотичен ефект (**III.4**).

Като трети клас синтезирани хибридни материали бяха изследвани такива, получени от SiO_2, HPC и медни йони. Структурно са охарактеризирани посредством XRD, IR и UV-Vis анализи. Антимикробният потенциал на материалите е изследван с помощта на референтни щамове за грам-положителни бактерии (*Bacillus subtilis* NBIMCC 3562), грам-отрицателни бактерии (*Escherichia coli* K12 NBIMCC 407) и дрожди (*Candida albicans* NBIMCC 74) (**II.3, II.10**).

Изследвани са и нанокомпозитни материали с участието на SiO_2, ZnO, TiO_2 и редуциран графенов оксид (RGO), както и материали на основата на TiO_2 и SeO_2. Всички те показват добри антибактериални свойства, което ги определя като подходящи и приложими в редица области (**I.5, II.2, II.14, II.17, II.19**).

Изследвана е токсичната толерантност и способността на щам *Trichosporon cutaneum* R57 за сорбция на йони на манган (Mn^{2+}) от водна среда. За мангановите йони прага на инхибиране е 5 mM $MnSO_4.H_2O$, 10 mM концентрация е умерена инхибиторна, тъй като се наблюдава промяна в клетъчната морфология, а 20 mM $MnSO_4.H_2O$ е летална за изследвания щам. Ефективността на сорбиране намалява с увеличаване на използваната концентрация на Mn^{2+}. Сорбцията е най-бърза в първите 30 минути като при концентрация 5 mM $MnSO_4$ тя е 61.67%, а при 10 mM $MnSO_4$ тя е 42.04%. При най-високата използвана концентрация – сорбцията е едва 27.27 %. С увеличаване на инкубационното време сорбцията нараства, но увеличението е до 3-4 %. Най-ефективна е сорбцията в първите 30 минути **(III.1).**

Проведени са изследвания върху възможността за консервиране на дървесина чрез нейното модифициране с алкално активиран хидролизен лигнин, Cu_2S и малеинов анхидрид чрез метода на проникване и е изследвано влиянието на процеса върху някои експлоатационни свойства на дървесния материал. Всички модифицирани образци проявяват антибактериална резистентност към Грам-отрицателни бактерии (*E. coli* K12), като най-голям ефект дава пробата, модифицирана с малеинов анхидрид **(I.9).** Лигноцелулозните отпадъчни материали, произведени след ензимната хидролиза на растителна сурова биомаса, са легирани със сребро и е доказано, че имат висок ефект при унищожаването на вредни бактерии, като Грам-положителени *Bacillus subtilis* 3562 и Грам-отрицателни *Escherichia coli* K12 във водни разтвори **(I.8).**

Публикувана е обзорна статия за приложението на нанотехнологиите в козметичната индустрия. Класифицирани са наноматериалите въз основа на тяхната химична природа като органични и неорганични. Към органичните спадат липозомите, наноемулсии, твърдо-липидни частици, нанокапсули, нанокристали, а към неорганичните – златни, сребърни наночастици, фулерен, нанотръбички. Анализирани са методите за проникване на наноматериалите през кожната бариера, както и е засегнат и въпросът за безопасността при употребата им **(II.18).**

2. Биосъвместимост и цитотоксичност на хибридни материали

Биосъвместимостта е способността на материалите да се имплантират в организма без да индуцират клетъчен отговор с цел достигане на оптимален терапевтичен ефект. Като най-важно условие се приема безопасността на материалите. Те трябва да не предизвикват алергични реакции и да нямат токсичен или канцерогенен ефект. Отговаряйки на тези изисквания, материалите се определят като биосъвместими. Биосъвместимите материали намират приложение в керамични нанопокрития, в костни импланти, в пластичната хирургия и др. Важно условие при приложението на биоматериали е те да могат да се резорбират в организма.

За прилагането на наночастици в биологията и медицината преди всичко е необходимо да се докаже тяхната биосъвместимост. Изследването на цитотоксичността на даден материал е първата стъпка от определянето на неговата биосъвместимост, по същество се определя биологичната реактивност на клетъчни линии на бозайници след контакт с материала. Едва след това се пристъпва към тестове *in vivo* и клинични

изпитвания. Цитотоксичността се отнася до увреждане на индивидуални клетки, например в клетъчни култури. Проучена е клетъчната преживяемост и адхезивността на 3T3 миши фибробласти върху хибридните материали със сребърни наночастици. Получените резултати разкриват нарастваща клетъчна пролиферация на 3T3 клетките, по-ясно изразена след 48 часа култивиране (**I.3, I.6, I.7**). По-високото съдържание на сребро води до по-ниска клетъчна преживяемост. Това от една страна може да се обясни със свойствата на среброто като антимикробен агент, а от друга с по-високата грапавост и контактен ъгъл, определени при структурното охарактеризиране на материалите, съдържащи сребро (**I.7**). Клетките, навлизащи в апоптоза при високи дози сребро, претърпяват характерни морфологични изменения. Те включват свиване и кондензиране на клетката, разрушаване на цитоскелета и ядрената обвивка, кондензиране на ядрения хроматин, който се разпада на фрагменти, което беше наблюдавано при материали с най-високо съдържание на сребро **(I.6).**

Много клинично значими патогенни бактерии са в състояние да колонизират, формирайки биофилми, които трудно се повлияват от традиционните антибиотици, поради образуваната резистентност спрямо тях. Ето защо се обръща все повече внимание на хибридните материали с включени сребърни наночастици и тяхната анти-биофилм ефикасност. Проучена е и анти-адхезионната способност на SiO_2/HPC/Ag и SiO_2/HPMC/Ag хибридни материали при формиране на биофилм от *P. aeruginosa* PAO1 **(I.7).** Резултатите показват значителна редукция на формирания биофилм, което е предпоставка тези материали да се използват в тъканното инженерство, в денталната медицина и при изготвяне на катетри, където не се изисква клетъчна адхезия. Изпитани са също и десет щама клинични изолати *P. aeruginosa*, резистентни на повече от два антибиотика, което ги определя като полирезистентни. Установено е наличие на бактерицидно действие и при трите използвани хибридни материала със сребърни наночастици, като се наблюдава концентрация зависима активност (**III.2**).

Серия от SiO_2/HPC хибридни материали, съдържащи цинк, бяха успешно получени по зол-гелния метод. Според инфрачервените спектри, хибридните материали показват типични ивици от SiO_2 мрежа и вибрации на Zn-O връзки. UV-Vis спектроскопията и TEM анализа доказват съществуването на наноразмерни Zn частици (5-10 nm). Материалите потискат растежа на бактериите и инхибиторния ефект съответства на съдържанието на цинк в пробите. Грам-положителни бактерии са по-чувствителни и водят до образуване на

17.5 mm инхибиторни зони, докато при Грам-отрицателните зоната е 11 mm. Периодът на инкубацията също повлиява бактериалния растеж. Материали, съдържащи цинк, които показват добри антибактериални резултати, в същото време са биосъвместими, не показващи промени в актиновия цитоскелет **(II.4).**

Проучени са биосъвместимостта и антигъбичните свойства на хибридни материали, съдържащи SiO_2/пектин и сребро. MTT теста разкрива добра преживяемост на миши фибробласти и удовлетворяваща организация на цитоскелета при материали, съдържащи до 1 wt. % сребро. В същото време композитите показват противогъбичен ефект срещу растежът на *C. albicans* 74, което ги прави потенциален кандидат за материал за *in vivo* импланти **(II.6).**

Интересна насока на работа представлява и проучването на цитотоксичността на хибридни материали, съдържащи SiO_2/целулоза и мед от различни източници. Резултатите показват, че цитотоксичният ефект на използваните материали зависи от използвания източник на Cu (сулфат или нитрат), количеството медни йони в композитни материали, тип клетка и времето за инкубация. Жизнеспособността на клетките е повлияна от двата типа композити, като материалът, получен с $CuSO_4.5H_2O$, е по-цитотоксичен. Изследвани са две клетъчни линии ракови клетки (белодробни клетки (A549) и ендотелни клетки (HUVEC)), като клетки A549 проявяват по-силна чувствителност. По този начин синтезираните композитни материали могат да служат за по-нататъшни изследвания и разработки, с цел прилагането им като нова и/или адювантна терапия на рака **(II.15).**

3. Синтез, охарактеризиране, анализ и изследване на активност на биомолекули с цел приложението им в медицината, фармацията и диагностиката.

Биоактивните пептиди са намерили приложение в различни области като фармация, парфюмерия, козметика, хранително-вкусова промишленост и др. В медицинската практика те се използват главно в области като онкология, ендокринология, травматология, диагностика и др. Антимикробните пептиди с противотуморна активност са голяма група биоактивни пептиди, които са намерили приложение в т.нар. таргетна терапия. Тя е една от най-надеждните терапии при онкозаболявания, към която голяма част от учените и лабораториите в света имат интерес и работят с цел подобряването на фармакокинетиката и фармакодинамиката на тези пептиди и използването им за доставката на фармакофорни молекули до определени клетки или тъкани.

Проучени са нови биоконюгати на монофлуорирани аналози на BIM-23052, съдържащи втори фармакофор нафталимид, кафеена киселина или трипептида Arg-Gly-Asp. Противораковият потенциал е изследван срещу панел от туморни клетъчни линии, включващи човешка млечна жлеза, карциномни клетъчни линии MCF-7 (ER+, PR+ и Her-2); MDA-MB-231 (ER-, PR- и Her-2-), както и клетъчни линии BALB 3T3 (миши ембрионални фибробласти) и MCF-10A (епителни клетки на човешката гърда). Най-активно съединение се оказва биоконюгат, съдържащ нафталимид като втори активен компонент в молекулата. Той е селективен за MCF-7 клетки и има най-малък антипролиферативен ефект по отношение на нетуморогенната линия MCF-10 клетки. И трите биоконюгата са практически нетоксични със стойности на IC_{50} > 1000 μM. За съжаление, хидролитичните проучванията за стабилност показват, че този биоконюгат е най-нестабилен на хидролиза в моделни системи имитиращи физиологични условия в човешкото тяло. Математическите докинг изчисления показват добри резултати за селективност спрямо някои от соматостатиновите рецептори. Конюгатът с кафеената киселина се свързва по-силно с SSTR1 и SSTR4, а този съдържа нафталимид към SSTR2 в сравнение с изходните съединения. Пептиден конюгат с трипептидът Arg-Gly-Asp има най-добра селективност за свързване към SSTR2. Това вероятно се дължи на оптималния брой взаимодействия, които допълнителните аминокиселини позволяват да бъдат реализирани с рецептора и подходящото пространствено разположение спрямо свързващия център на рецептора **(I.10)**.

Направен е дизайн и са синтезирани и охарактеризирани аналози на единичната и удвоената последователност на антимикробния пептид с допълнителна противотуморна активност $(KLAKLAK)_2$-NH_2 чрез въвеждане на неприродните аминокиселини Nle и β-Ala в първичната му структура. Направен е дизайн, синтезирани и охарактеризирани са биоконюгати на скъсените и удвоени аналози на единичната последователност на антимикробния пептид $(KLAKLAK)_2$-NH_2 с втори фармакофор с доказана антитуморна активност 1,8-нафталов анхидрид и кафеена киселина. Изследвани са антибактериални свойства, антипролиферативен ефект, цитотоксичност на всички новосинтезирани аналози и конюгати на $(KLAKLAK)_2$-NH_2 и са изведени важни зависимости структура-биологична активност **(II.8, II.9, II.12).** *Candida albicans* е опортюнистичен патоген, вид диморфна гъбичка с псевдомицелна и дрождева форма, която се възпроизвежда чрез пъпкуване, и е

най – разпространена в стомашно - чревния тракт. Тя е коменсален микроорганизъм, част от резидентната микрофлора на здравите индивиди от човешката популация. При определени обстоятелства обаче тя може да доведе до чревни, вагинални и храносмилателни проблеми. При изследване антифунгистатичните свойства на синтезираните биоконюгати най-висока активност спрямо *C. albicans* 74 показват пептидите, съдържащи втори фармакофор 1,8-нафталов анхидрид или кафеена киселина (**II.9**).

През последните години популярността на билковите лекарства и хранителни добавки се увеличава по целия свят поради многото странични ефекти, свързани със синтетичните лекарства. Хората непрекъснато търсят "изцяло естествени" продукти. Недекларираните лекарства или синтетични съединения в ботаническите продукти могат да бъдат не само токсични, но и често да взаимодействат с други медикаменти, отпускани с рецепта и следователно в резултат на това могат да предизвикат неблагоприятни ефекти, които биха могли дори да бъдат дори живото-застрашаващи. Подправянето се състои в заместване на оригиналната сурова билка или екстракт от нея частично или напълно с друг материал, който няма терапевтична стойност или има по-ниска такава. Това подправяне се извършва на базата на прилика в морфологичните характеристики на добавяната субстанция и оригиналната билка. Използва се също фалшифициране със синтетични химически лекарства, за да се повиши ефективността на хранителната добавка, най-често при тези против наднормено тегло, затлъстяване, антидиабетни препарати, такива за потентност др. Този вид фалшифициране може да доведе до сериозни здравословни проблеми, вследствие на продължителното приемане на хранителната добавка.

Разработен и валидиран е течнохроматографски метод с УВ детекция за определяне на шест забранени активни субстанции йохимбин, варденафил, силденафил, тадалафил, дапоксетин и сибутрамин в хранителни добавки за еректилна дисфункция и отслабване **(II.7).** Разработен и валидиран е течнохроматографски метод с УВ детекция за определяне на тринадесет вещества със стероидна структура тестостерон, тестостерон пропионат, тестостерон енантат, метилтестостерон, нандролон, нандролон пропионат, нандролон деканоат, метандиенон, андростендион, тренболон, тренболон ацетат, тренболон енантат, болденон ундециленат в хранителни добавки за спорта. Разработен е потвърдителен GC/MS метод, който може да се използва и за скрийнинг за определяне наличието или отсъствието

на седемнадесет вещества със стероидна структура тестостерон, тестостерон пропионат, тестостерон енантат, метилтестостерон, нандролон, нандролон фенилпропионат, нандролон деканоат, метандиенон, андростендион, тренболон ацетат, тренболон енантат, оксандролон, станозолол, дростаолон пропионат, дростанолон енантат, болденон ундециленат в хранителни добавки за спорта **(II.16).**

Изследвани са структурни аналози на мемантин, който има активно действие при борба с Алцхаймер. Получените резултати показват, че аналози, съдържащи неприродната аминокиселина β-Ala са активни само срещу *E. coli* K12 407. Аналози с ароматна аминокиселина Phe, както и тези с β-Ala не са активни срещу Грам-положителни бактерии. Въвеждане на обемна аминокиселина Phe, съдържаща ароматно ядро и Val, съдържащо алифатно ядро, води до добра противогъбична активност **(II.13)**.

ПЕРСПЕКТИВИ ЗА БЪДЕЩА РАБОТА

1. Синтез, структурно охарактеризирани и биологични свойства на нови хибридни материали, базирани на безопасни и достъпни полимери и метални агенти.
2. Изследване биосъвместимостта и антибиофилмния потенциал на нови хибридни материали за приложение в медицинската практика.
3. Синтез и изследване на нови биомолекули на основата на модифицирани аминокиселини, пептиди и гликопептиди с потенциални противотуморни и антимикробни свойства.
4. Инкорпориране на биомолекули с антибактериални свойства чрез различни методи в хибридни матрици.