

**Резюмета на научните публикации
на доц. д-р Наталия Кръстева
на български език
за участие в конкурс
за академичната длъжност „професор”,
обявен в Държавен вестник, брой 109 от 21.12.2021 г.**

B1. M. Keremidarska-Markova, K. Hristova-Panusheva, T. Andreeva, G. Speranza, D. Wang, and N. Krasteva (2018) Cytotoxicity Evaluation of Ammonia-Modified Graphene Oxide Particles in Lung Cancer Cells and Embryonic Stem Cells. *Advances in Condensed Matter Physics*, 2018:9571828.

Резюме: Потенциалната токсичност на графеновия оксид (GO) е обект на нарастващ изследователски интерес през последните години. Тук ние определихме цитотоксичността на модифицирани с амоняк (GO-NH₂) и чисти частици от GO в човешки ракови клетки от бял дроб, A549 и ембрионални стволови клетки, Lep3, третиран с различни концентрации на частиците (0,1, 1, 10, 20 и 50 µg/ml) за различни периоди (24 и 48 часа). В сравнение с чистите GO, GO-NH₂ частиците имат по-малък размер, положителен повърхностен заряд и по-голяма дебелина. Повишена склонност към агрегация в клетъчните култури е установена за GO-NH₂ частици. Оценката на цитотоксичността разкрива, че GO-NH₂ са по-токсични от чистия GO. Третирането с концентрации от 10, 20 и 50 µg/ml за 24 часа, значително повлиява клетъчната морфология на ембрионални стволови клетки, докато клетките A549 от рак на белия дроб изглеждат относително по-устойчиви при краткосрочна експозиция. След 48-часово третиране обаче клетъчната пролиферация на A549 клетки е силно потисната по дозо-зависим начин, докато пролиферацията на ембрионалните стволови клетки не е засегната. Тези резултати предполагат, че и двата вида GO частици проявяват различна степен на цитотоксичност, която зависи от времето, дозата и вида на клетките. Като цяло, модифицираните с амоняк GO частици са по-токсични от чистия GO, което трябва да се вземе предвид в бъдещите биомедицински приложения.

B2. K. Hristova-Panusheva, M. Keremidarska-Markova, T. Andreeva, G. Speranza, D. Wang, M. Georgieva, G. Miloshev and N. Krasteva (2019) Dose-dependent genotoxicity of ammonia-modified graphene oxide particles in lung cancer cells. *J Phys:Conf Ser*, 1186: 012009.

Резюме: Графеновият оксид (GO), водоразтворимата форма на 2D графен, е получил голямо внимание поради атрактивните си свойства за широк спектър от приложения и продукти. Модификацията на повърхността с различни функционални групи може да подобри биосъвместимостта на GO за по-нататъшни биомедицински приложения. В настоящото проучване ние изследвахме генотоксичността на чисти и модифицирани с амоняк графенов оксид (GO-NH₂) наночастици (NPs) върху човешка белодробна епителна клетъчна линия, A549, третиран в просължение на 24 часа с различни концентрации от наночастиците (0,1, 1, 10 20 и 50 µg/ml). Количественото определяне на реактивните кислородни видове (ROS) показва, че излагането на по-високи концентрации и от двата типа NPs води до повишено производство на ROS. Наблюдаваното повишение в

дължината на опашките на кометите при метода на едноклетъчна гел електрофореза в клетки, третирани с 20 и 50 µg/ml GO и GO-NH₂, показва наличие на увреждания в ДНК. Анализът на клетъчния цикъл показва, че след третиране на клетки A549 с нарастващи концентрации на NPs за 24 часа процентът на клетките във фазата G0/G1 на клетъчния цикъл намалява, докато процентът на клетките в G2/M се увеличава. Представените резултати предполагат, че модифицираните с амоняк GO NPs, при концентрации по-високи от 20 µg/ml, предизвикват по-силен токсичен ефект в клетките A549 в сравнение с чистите GO и че използването на ниски концентрации на GO и GO-NH₂ NPs е важно за избягване на неблагоприятни биологични ефекти.

В3. N. Krasteva, M. Keremidarska-Markova, K. Hristova-Panusheva, T. Andreeva, G. Speranza, D. Wang, M. Draganova-Filipova, G. Miloshev and M. Georgieva (2019) Aminated Graphene Oxide as a Potential New Therapy for Colorectal Cancer, *Oxidative Med Cell Longev*, 2019;2019:3738980.

Резюме: Базираните на нанотехнологии системи за доставяне на лекарства за терапия на рак са тема за много изследователи и учени. Графеновият оксид (GO) и неговите производни са сред най-изследваните системи за доставка от този тип. Увеличената площ, повишеният капацитет на натоварване и способността за функционализиране на повърхността, заедно със способността за индуциране на реактивни кислородни видове, правят GO обещаващ инструмент за разработване на нови противоракови терапии. Освен това, GO наночастиците не само функционират като ефективни носители на лекарства, но също така имат потенциала да упражняват свой собствен инхибиторен ефект върху туморните клетки. Последните резултати показват, че функционализацията на GO с различни функционални групи, по-точно с аминогрупи, води до повишена реактивност на наночастиците. Последното насочва различни хипотези за механизмите, чрез които тази функционализация на GO може потенциално да доведе до подобрен противораков капацитет. В това изследване ние оценихме потенциала на amino-функционализираните наночастици от графенов оксид (GO-NH₂) като нови молекули за терапия на колоректален рак. За целта ние оценихме въздействието на наночастиците от аминиран графенов оксид (GO) върху жизнеспособността на раковите клетки на дебелото черво, техния потенциал да генерират ROS и да влияят на клетъчната пролиферация и преживяемост. За да изясним механизма им на действие върху клетъчните системи, ние изследвахме техните генотоксични и цитостатични свойства и ги сравнихме с чистия GO. Нашите резултати показаха, че и двата вида GO (чисти и аминирани) са съставени от няколко слоя листа с различни размери на частиците, зета потенциал и повърхностни характеристики. Открихме повишена цито- и генотоксичност на аминираните GO наночастици след 24-часово третиране на клетки от Colon26. Последното ни кара да заключим, че излагането на ракови клетки на GO, по-точно на аминиран GO, може значително да повлияе върху раковите клетки.

В4. M. Georgieva, B. Vasileva, G. Speranza, D. Wang, K. Stoyanov, M. Draganova-Filipova, P. Zagorchev, V. Sarafian, G. Miloshev and N. Krasteva (2020) Amination of graphene oxide leads to increased cytotoxicity in hepatocellular carcinoma cells. *Int J Mol Sci* , 21(7), 2427.

Резюме: Има спешна необходимост от идентифициране на нови терапевтични стратегии за селективно третиране на ракови клетки за клинично приложение. Една от насоките в

това изследване е разработването на биосъвместими терапевтични средства, които са избирателно насочени към раковите клетки. Тук ние показваме, че нови наночастици от аминиран графенов оксид (haGO-NH₂) демонстрират повишена токсичност към човешки хепатоцелуларни ракови клетки в сравнение с чистия графенов оксид (GO). Приложената нова стратегия за аминирание води до намаляване на размера на haGO-NH₂ и техния зета потенциал, като по този начин осигурява по-лесно проникване през клетъчната мембрана. След охарактеризиране на биологичната активност на чистия и аминиран GO, ние установихме силна цитотоксичност на haGO-NH₂ спрямо чернодробни ракови клетки от клетъчна линия HepG2, в дозо-зависим начин. Доказахме, че цитотоксичните ефекти на haGO-NH₂ върху чернодробните ракови клетки се дължат на увреждане на клетъчната мембрана, митохондриална дисфункция и повишено производство на реактивни кислородни видове (ROS). Настоящото проучване предоставя нова обосновка за използване на аминирания графенов оксид като противораково средство.

B5. N. Krasteva, D. Staneva, B. Vasileva, G. Miloshev and M. Georgieva (2021) Bioactivity of pegylated graphene oxide nanoparticles combined with near-infrared laser irradiation studied in colorectal carcinoma cells. *Nanomaterials*, 11(11): 3061.

Резюме: Централен фокус в съвременните противоракови наносистеми се отделя на определени видове наноматериали като графенов оксид (GO). Функционализацията му с полиетилен гликол (PEG) демонстрира висока ефективност на доставяне и контролирано освобождаване на протеини, визуализиращи агенти, химиотерапевтици и противоракови лекарства. GO-PEG има добър профил на биологична безопасност, показва висока NIR абсорбция и капацитет при фототермична обработка. За изследване на биоактивността на PEGylated GO NPs в комбинация с NIR облъчване върху колоректални ракови клетки, ние проведехме експерименти, които имат за цел да разкрият молекулярните механизми на действие на този наноносител, комбиниран с облъчване в близка инфрачервена светлина (NIR) върху високоинвазивния Colon26 и ниско инвазивни HT29 клетъчни линии от рак на дебелото черво. По време на транспорта до ракови клетки фототоксичността на GO-PEG се модулира чрез NIR лазерно облъчване. Ние наблюдавахме, че ПЕГилирането на GO наночастици има добре изразена биосъвместимост към клетките на колоректален карцином, независимо от инвазивния им потенциал и продължителност на третиране. Тази биосъвместимост се засилва, когато третиране с GO-PEG се комбинира с NIR облъчване, особено за клетки, култивирани и третирани в продължение на 24 часа. Изследваната биоактивност на GO-PEG в комбинация с NIR облъчване предизвиква малки или никакви увреждания в ДНК и не повлиява митохондриалната активност. Нашите резултати демонстрират потенциала на фотоактивността, базирана на GO-PEG, като наносистема за лечение на колоректален рак.

B6. Z. Gospodinova, T. Kamenska, Gencheva G, M. Georgieva, N. Krasteva. PEGylation of graphene oxide nanosheets modulate cancer cell motility and proliferative ability, *Journal of Physics: Conference Series*, 2021, 1762(1), 012001, SJR:0.227.

Резюме: Напоследък графеновият оксид (GO) все повече се изследва за неговите биомедицински и биологични приложения, включително при ракови заболявания. Интересът е насочен към химичните модификации на GO и тяхното значение в разработването на терапевтични подходи за различни заболявания. Последните данни

показват, че ПЕГилирането на наночастици (НЧ) подобрява разтворимостта и стабилността на НЧ във физиологичните разтвори и променя тяхната реактивност към раковите клетки. В тази работа ние изследвахме ефекта на пегилирани GO наночастици върху миграционната и пролиферационна способност на A375 меланомни клетки, използвани като модел на ракови клетки, и го сравнихме с този на нормалните бъбречни MDCK клетки. И двата типа GO, чисти и ПЕГилирани, демонстрират инхибиращ ефект върху пролиферацията и мобилността на раковите клетки, докато върху нормалните MDCK клетки ефектът на GO е значително по-слаб при 48 часа експозиция, което предполага, че раковите A375 клетки са по-чувствителни към GO и GO-PEG третиране. Като цяло, ПЕГилирането смекчава инхибиторния ефект на GO върху растежа и миграционната способност на меланомните клетки. Нашите резултати доказват, че ефектите на двата вида графенови наночастици върху пролиферацията и мобилността на раковите клетки са зависими от дозата, вида на наночастиците и вида на клетките, следователно помагат при бъдещия дизайн и използване на наноматериали на базата на графен за изследване на рака.

B7. M. Georgieva; Z. Gospodinova; M. Keremidarska-Markova; T. Kamenska; G. Gencheva and N. Krasteva (2021) PEGylated nanographene oxide in combination with near-Infrared laser irradiation as a smart nanocarrier in colon cancer targeted therapy. *Pharmaceutics*, 13(3): 424.

Резюме: Противораковите терапии, които интегрират интелигентни наноматериали, са в центъра на изследванията на рака през последните години. Тук представяме нашите резултати с ПЕГилиран частици нанографен оксид (nGO-PEG) и техния комбиниран ефект с облъчване в близката инфрачервена област (NIR) върху ниско и високо инвазивни клетки от колоректален карцином. Целта е nGO-PEG да се разработи като интелигентен наноносител за насочена терапия за рак на дебелото черво. За тази цел размерът на nGO-PEG наночастиците, зета потенциалът, морфологията на повърхността, стабилността във дисперсията, агрегацията и стерилността бяха измерени и сравнени с чисти nGO наночастици (NPs). Нашите резултати показват, че ПЕГилирането увеличава размерите на частиците от 256,7 nm (чист nGO) до 324,6 nm (nGO-PEG), зета потенциала от -32,9 до -21,6 mV и набръчка повърхността на наночастиците. Освен това, nGO-PEG показва по-висока абсорбция в NIR областта в сравнение с немодифицирания nGO. ПЕГилираният nGO демонстрира повишена стабилност във воден разтвор, подобрена възможност за разпределяне в клетъчно-култивиращата среда, съдържаща 10% фетален говежди серум (FBS) и променена биосъвместимост. Наблюдава се силен синергичен ефект на nGO-PEG, активиран с NIR облъчване за 5 минути (1,5 W/cm² лазер) върху инхибиране на клетъчния растеж на нискоинвазивни ракови клетки от дебелото черво (HT29) и тяхната способност за зарастване на рани, докато ефектът само на NIR върху клетъчната морфология беше относително слаб. Нашите резултати показват, че ПЕГилирането на nGO, комбинирано с NIR облъчване, притежава потенциала за биосъвместим интелигентен наноносител в ракови клетки на дебелото черво с подобрени физикохимични свойства и по-висока биологична съвместимост. Поради тази причина по-нататъшното оптимизиране на процеса на облъчване и подробен скрининг на nGO-PEG в комбинация с NIR и химиотерапевтици върху съдбата на раковите клетки на дебелото черво е предпоставка за високоефективна комбинирана химио- и фототермална терапия за рак на дебелото черво.

Г1. Т. Kamenska, М. Abrashev, М. Georgieva and N. Krasteva (2021) Impact of Polyethylene Glycol Functionalization of Graphene Oxide on Anticoagulation and Haemolytic Properties of Human Blood. *Materials*, 14(17), 4853.

Резюме: Графеновият оксид (GO) е един от най-изследваните наноматериали през последните години. Той има множество биомедицински приложения, включително за доставяне на лекарства и гени, за контрастно изображение, за лечение на рак и т.н. Тъй като повечето от тези приложения се нуждаят от интравенозно вкарване на графеновия оксид и неговите производни, оценката на тяхната хемосъвместимост е съществена предварителна стъпка за всяко едно от приложенията на GO. Множество данни показват, че функционализацията на наночастиците от графенов оксид с полиетилен гликол (PEG) повишава биосъвместимостта, като по този начин пегилирания GO предизвиква по-малко негативни ефекти върху кръвните клетки в сравнение с немодифицираните частици. Ето защо, в тази работа ние ПЕГилирахме наночастици от графенов оксид и изследвахме ефектите от тяхното ПЕГилиране върху структурата и функцията на човешките кръвни компоненти, най-вече върху морфологията и хемолитичния потенциал на червените кръвни клетки (RBC). Освен това, изследвахме ефекта на ПЕГилирането върху някои фактори на коагулацията на кръвта, включително плазмения фибриноген, времето за частично активиране на тромбопластина (аРТТ), протромбиновото време (РТ), и върху тромбоцитната агрегация. Нашите открития предоставят важна информация за механизмите, чрез които ПЕГилирането повишава съвместимостта на GO с човешки кръвни клетки. Тези данни са от решаващо значение за молекулярния дизайн и биомедицинските приложения на ПЕГилираните наноматериали от графенов оксид в бъдеще.

Г2. G. Xiao, H. Chen, N. Krasteva, Q. Liu and D. Wang (2018) Identification of interneurons required for the aversive response of *Caenorhabditis elegans* to graphene oxide. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1):45.

Резюме: Предистория: Досега все още не е ясно как животните избягват наноматериалите в околната среда. В това проучване ние използвахме *in vivo* система за анализ на *Caenorhabditis elegans*, за да изследваме поведението на нематодите в отговор на въздействието на графеновия оксид (GO) и лежащата в основата на това поведение невронна основа. Резултати: В изследвания модел ние открихме силен негативен ефект на GO при концентрации над 50 mg/L върху нематодите. Мутацията на загуба на функция на *nlg-1*, кодираща невролигин с функцията за свързване на пре- и постсинаптичните неврони, потиска негативния отговор на нематодите към GO. Освен това, въз основа на анализа на невроспецифичната активност, ние открихме, че активността на NLG-1 в AIY или AIB интерневроните е необходима за регулиране на негативното поведение към GO. Специфичните за невроните активности на NLG-1 в AIY или AIB интерневрони също бяха необходими за регулиране на GO токсичността. Заключение: Използвайки *nlg-1* мутант като генетичен инструмент, ние идентифицирахме AIY и AIB интерневроните, необходими за регулиране на негативното поведение към GO. Нашите резултати осигуряват важна невронна основа за негативния отговор на животните към наноматериалите в околната среда.

Г3. M. Ren, L. Zhao, X. Ding, N. Krasteva, Q. Rui and D. Wang (2018) Developmental basis for intestinal barrier against the toxicity of graphene oxide. *Particle and Fibre Toxicology* 15(1):26.

Резюме: Предистория: Чревната бариера е от решаващо значение за животните срещу транслокацията на инженерните наноматериали (ENM) във вторични целеви органи. Въпреки това, молекулярните механизми на ролята на чревната бариера срещу токсичността на ENMs все още са до голяма степен неясни. Червата на *Caenorhabditis elegans* е мощна *in vivo* експериментална система за изследване на чревната функция. В това проучване ние изследвахме молекулярната основа за чревната бариера срещу токсичност и транслокация на графенов оксид (GO), използвайки *C. elegans* като моделно животно. Резултати: Въз основа на генетичния скрининг на гени, необходими за контрола на чревното развитие в различни аспекти, използвайки техниката за специфична за червата РНК интерференция (RNAi), ние идентифицирахме четири гена (*erm-1*, *pkc-3*, *hmp-2* и *act-5*) необходими за функцията на чревната бариера срещу токсичността на GO. При нормални условия мутацията на всеки един от тези гени променя чревната пропускливост. С фокус върху PKC-3, атипична протеин киназа C, ние идентифицирахме чревна сигнална каскада PKC-3-SEC-8-WTS-1, което предполага, че PKC-3 може да регулира чревната пропускливост и GO токсичността чрез повлияване на функцията на SEC-8-медиран екзоцистен комплекс и ролята на WTS-1 в поддържането на целостта на апикалната чревна мембрана. ISP-1 и SOD-3, два протеина, необходими за контрола на оксидативния стрес, също бяха идентифицирани като мишени надолу по веригата за PKC-3 и функционираха успоредно с WTS-1 в регулирането на токсичността на GO. Заключение: Използвайки *C. elegans* като *in vivo* система за анализ, ние открихме, че няколко от гените необходими за контрола на чревното развитие, регулират както чревната пропускливост, така и GO токсичността. С фокуса върху PKC-3, ние идентифицирахме две чревни сигнални каскади, PKC-3-SEC-8-WTS-1 и PKC-3-ISP-1/SOD-3. Нашите резултати ще подобрят разбиране за молекулярната основа за механизма за формиране на чревната бариера срещу GO-токсичност и транслокация при животни.

Г4. L. Zhao, J. Kong, N. Krasteva and D. Wang (2018) Deficit in the epidermal barrier induces toxicity and translocation of PEG modified graphene oxide in nematodes., *Toxicology Research*, 7(6):1061-1070.

Резюме: Основата за развитие на епидермалната бариера срещу транслокацията на наноматериали все още е до голяма степен неясна в организмите. Тук изследвахме ефекта на дефицитите в епидермалната бариера върху транслокацията и токсичността на PEG модифициран графенов оксид (GO-PEG) в *Caenorhabditis elegans*. При дивия тип или NR222 нематоди, експозицията на GO-PEG не причинява токсичност и не повлиява експресията на гени, свързани с развитието на епидермиса. Въпреки това, експозицията на GO-PEG води до токсичност при *mlt-7* (RNAi) нематоди с дефицит във функцията на епидермалната бариера. Нокдаунът на епидермалната RNAi на *mlt-7* позволява натрупване на GO-PEG и транслокация в целеви органи през епидермалната бариера. Свързаните с епидермалното развитие протеини на BLI-1 и IFB-1 бяха идентифицирани като мишени за MLT-7 при регулирането на GO-PEG токсичността и отчитат функцията на MLT-7 при поддържане на епидермалната бариера. ААК-2, каталитична α субединица на AMP-активирана протеин киназа, беше идентифицирана като друга цел за MLT-7 в регулирането на GO-PEG токсичността. ААК-2 функционира синергично с BLI-1 или IFB-

1 в регулирането на GO-PEG токсичността. Нашите данни осигуряват молекулярната основа за ролята на епидермалната бариера срещу токсичността и транслокацията на наноматериали в организмите.

Г5. L. Zhao, S. Dong, Y. Zhao, H. Shao, N. Krasteva, Q. Wu and D. Wang (2019), Dysregulation of let-7 by PEG modified graphene oxide in nematodes with deficit in epidermal barrier. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169, 1-7. DOI:10.1016/j.ecoenv.2018.10.106.

Резюме: При нематоди от вида *Caenorhabditis elegans*, нокдаун на епидермалната интерферираща РНК (RNAi) на гена *bli-1*, кодиращ кутикуларния колаген, причинява индукция на токсичност на GO-PEG (PEG-повърхностно модифициран графенов оксид). В това проучване ние открихме, че и нокдаунът на епидермалната RNAi на *bli-1* повишава експресията на микроРНК *let-7*, а мутацията на *let-7* потиска чувствителността на *bli-1* (RNAi) нематоди към GO-PEG токсичност. *Let-7* регулира индуцирането на токсичност на GO-PEG чрез потискане на експресията и функцията на неговите директнитаргети (*HBL-1* и *LIN-41*). Подобно на нематодите с нокдаун на епидермална RNAi на *bli-1*, нокдаун на епидермалната RNAi на *hbl-1* или *lin-41* също предизвиква функционална аномалия в епидермалната бариера. Следователно, сигнална каскада от *BLI-1-let-7-HBL-1/LIN-41* беше усилена, за да участва в индукцията на токсичността на GO-PEG. Нашите данни предполагат дисрегулация на *let-7*-медиацияния молекулярен механизъм за контрол на времето за развитие от GO-PEG при нематоди с дефицит в епидермалната бариера, причинен от *bli-1* (RNAi).

Г6. H. Shao, Z. Han, N. Krasteva and D. Wang (2019) Identification of signaling cascade in the insulin signaling pathway in response to nanopolystyrene particles, *Nanotoxicology*, 13(2):174-188.

Резюме: Молекулярният отговор на животните към нанопластмасовите частици все още е до голяма степен неясен. В това проучване ние използвахме модифицирана система за продължително излагане, за да изследваме молекулярния отговор на *Caenorhabditis elegans* към частици от нанополистирол. Излагането на нанополистиренови частици (1 µg/L) значително намалява експресията на *daf-2*, кодиращ инсулинов рецептор, *age-1*, кодиращ PI3K, и *akt-1*, кодиращ Akt/PKB, и повишава експресия на *daf-16*, кодиращ FOXO транскрипция фактор в инсулиновия сигнален път. Сред тези гени, мутациите на *daf-2*, *age-1* или *akt-1* индуцират резистентност, докато мутацията на *daf-16* индуцира повишена чувствителност към токсичността на нанополистироновите частици. Нокдаунът на RNAi на *daf-16* може допълнително да потисне резистентността на *daf-2*, *age-1* или *akt-1* към токсичността на частиците от нанополистирол. Инсулиновият сигнален път действа в чревните клетки, за да регулира токсичността на частиците от нанополистирол. В допълнение, *sod-3*, кодиращ манганова супероксиддисмутаза, *mtl-1*, кодиращ металотионеин, и *gpd-2*, кодиращ глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа, бяха идентифицирани като гени, насочени надолу по веригата за *daf-16* в регулирането на токсичността на частите от нанополистирол. Следователно, сигналната каскада, съставена от *DAF-2-AGE-1-AKT-1-DAF-16-SOD-3/MTL-1/GPD-2* беше идентифицирана в отговор на нанополистиренови частици в нематоди. Тази сигнална каскада в инсулиновия сигнален път може да медира защитен отговор за нематоди срещу неблагоприятните ефекти от нанополистироновите частици.

Г7. М. Keremidarska-Markova, E. Radeva, D. Mitev, K. Hristova-Panusheva, B. Paull, P. Nesterenko, J. Šepitka, I. Junkar, A. Iglič and N. Krasteva (2018) Increased elastic modulus of plasma polymer coatings reinforced with detonation nanodiamond particles improves osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Turkish Journal of Biology*, 42(2): 195.

Резюме: В настоящото изследване ние демонстрирахме, че композитните PPHMDS/DND покрития с еластични модули, близки до тези на костната тъкан на възрастни индивиди (0,2–2,8 GPa) стимулират растежа и остеогенната диференциация на мезенхимни стволови клетки, получени от човешки мастни клетки (hADMSCs). Композитните покрития бяха получени по метода на плазмената полимеризация (PP), където детонационни нанодиамантени (DND) частици в различни количества (0,1, 0,5 и 1 mg/mL) бяха добавени към хексаметилдисилоксан (HMDS) преди плазмено отлагане. Този метод позволява промяна само в модула на еластичност (E_r), с увеличаване на концентрацията на частиците, докато другите повърхностни свойства, включително повърхностно омекване и топография, не се променят. Отговорът на hAD-MSCs към нарастващата твърдост показва ефект върху адхезията и остеогенната диференциация, но не и върху клетъчната пролиферация. Минерализацията на екстрацелуларния матрикс и разпределението на клетките бяха най-високи върху PPHMDS/DND покрития с най-висок модул на еластичност (2,826 GPa), докато разликите в пролиферацията между отделните покрития бяха незначителни. Като цяло, PPHMDS/DND покритията осигуряват по-добри условия за растеж и остеогенна диференциация на hAD-MSCs в сравнение със покривните стъкла, използвани като положителни контроли, потвърждавайки тяхната възможност за приложения за остео-интеграция. Освен това, нашите резултати подкрепят хипотезата, че биоматериали с еластичност, близка до тази на нативната тъкан, могат да подобрят диференциацията на мезенхимните стволови клетки.

Г8. В. Świerczek-Lasek, M. Keremidarska-Markova, K. Hristova-Panusheva, T. Vladkova, M. A. Ciemerych, K. Archacka and N. Krasteva (2019) Polydimethylsiloxane materials with supraphysiological elasticity enable differentiation of myogenic cells. *J Biomed Mater Res A*, 107:2619-28.

Резюме: Миогенната диференциация по време на мускулна регенерация се ръководи от различни физични и биохимични фактори. Напоследък еластичността на субстрата привлече вниманието като физически сигнал, който влияе както върху клетъчната диференциация, така и върху регенерацията на тъканите. В тази работа ние изследвахме влиянието на еластичността на субстрата върху пролиферацията и диференциацията на миогенни клетки: миши миобласти от клетъчната линия C2C12 и миши първични миобласти, получени от сателитни клетки - мускулни стволови клетки, които играят ключова роля в мускулната регенерация. Материали с различни еластични модули в рамките на MPa скалата на базата на полидиметилсилоксан (PDMS) бяха използвани като клетъчен субстрат и характеризирани за грапавост на повърхността, омекваемост и микромеханични характеристики. Открихме, че повърхностните свойства на PDMS субстратите се променят нелинейно с увеличаването на модула на еластичност на материала. Използвайки тази система, ние предоставяме доказателство, че материали с модул на еластичност, по-висок от този на физиологичната скелетна мускулна тъкан, не нарушават миогенната диференциация на двата типа миобласти; по този начин може да се

използва като биоматериали за инженерство на мускулната тъкан. PDMS материалите с еластичност в диапазона от 2,5–4 МПа могат временно да ограничат пролиферацията на миобластите, но не и ефективността на тяхната диференциация. Не се наблюдава пряка корелация между еластичността на субстрата и ефективността на миогенна диференциация, но другите повърхностни свойства на PDMS материалите, като нанограпавост и омокряемост, също са различни.

Г9. T. Nikov, N. Krasteva, K. Hristova-Panusheva, N. Ivanov and P. Petrov (2019) Study on the biocompatibility of TiN/TiO₂ bilayer coatings deposited by DC magnetron sputtering on stainless steel, *AIP Conference Proceedings*, 2075, 160022.

Резюме: Многослойните покрития като TiN/TiO₂ се използват широко в съвременната медицина включително и дентална медицина. Те подобряват механичните свойства на субстрата и неговата биосъвместимост. Субстрати могат да бъдат различни видове метали, сплави, които се използват за производство на импланти, ротационни стоматологични инструменти, ендодонтски инструменти, стави и др. Очаква се материалите да бъдат универсално приети и да не причиняват вреда или нараняване на околните тъкани. Следователно, в това изследване, многослойни покрития от TiN/TiO₂ бяха отложени върху неръждаема стомана 304 чрез DC магнетронно разпрашване. Структурата на покритията беше наблюдавана чрез XRD (рентгенова дифракция) с Cu K α характеристично излъчване (1.54 Å). Измерванията бяха проведени в симетричен режим на Bragg- Brentano (B-B), от 20° до 80° в скала 2 θ . Стъпката е избрана 0,1° с време за броене 10 сек. на стъпка. Биосъвместимостта на покритията е изследвана чрез ССК-8 анализ на остеобластни MG63 клетки, инкубирани в продължение на 72 часа върху пробите. Нашите резултати показваха, че получените TiN/TiO₂ многослойни покрития имат стехиометрия и не потискат клетъчния растеж и разпространение, което означава, че покритията не са цитотоксични и са биосъвместими.

Г10. A. A. Haroun, Z. Gospodinova, N. Krasteva (2021) Amino Acid Functionalization of Multi-Walled Carbon Nanotubes for Enhanced Apatite Formation and Biocompatibility, *Nano Biomedicine and Engineering*.13 (4):380-393, SJR-0.252.

Резюме: Ограничение в костно-тъканното инженерството е липсата на налични естествени или синтетични биоматериали за заместване на костната тъкан при нужда. Въглеродните нанотръбички имат голям потенциал като скафолд на костната тъкан поради техните забележителни механични и електрически свойства, съчетани с високо съотношение на страните. В тази работа ние демонстрирахме за първи път нов подход, базиран на зол-гел техниката за функционализиране на многостенни въглеродни нанотръби (MWCNT) с две аминокиселини: L-аргинин, L(+) Arg и L-аспаргин, L(+) Asp. Изследвахме ефекта на двете функционалности върху физико-химичните свойства на MWCNTs, цитотоксичността в остеосаркомни MG63 клетки и нормалните фибробластни VJ клетки и способността да индуцират нуклеация и растеж на хидроксиапатитни (HA) кристали *in vitro* при физиологични концентрации на Ca²⁺ и PO₄⁻ (SBF). Материалите бяха охарактеризирани с помощта на инфрачервена спектроскопия с трансформация на Фурие (FTIR-ATR), техника за динамично разсейване на светлината (DLS), рентгенова дифракция (XRD), термогравиметричен анализ (TGA) и сканираща електронна микроскопия (SEM). Резултатите показват, че и двете функционализирани MWCNT имат

размер на частиците от 269 и 411 nm, зета потенциал съответно $-12,8$ и $-8,8$ mV, висока колоидна стабилност, подобрена биосъвместимост и засилено образуване на апатитен слой върху повърхността на скелета в сравнение с нефункционализираните ox-MWCNTs. Като цяло резултатите потвърждават важната роля на аминокиселините L(+) Arg и L(+) Asp в композитите на базата на ox-MWCNTs за приложения в костната тъкан.

Г11. D. Gugutkov, F. Awaja, K. Belezova, M. Keremidarska, N. Krasteva, S. Kuyrkchiev, G. GallegoFerrer, S. Seker, A.E. Elcin, Y.M. Elcin and G. Altankov (2017) Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells using hybrid nanofibers with different configurations and dimensionality. *J Biomed Mater Res Part A*, 1, 552-4965.

Резюме: Нови, хибридни нановлакна от фибриноген и полимлечна киселина (FBG/PLA) с различна конфигурация (случайна и подредена) и размерност (2-D срещу 3-D) бяха използвани за контролиране на поведението и остеогенната диференциация на мезенхимни стволови клетки, получени от човешката мастна тъкан (ADMSCs). Доказано е, че подредените нановлакна както в 2-D, така и в 3-D конфигурации са предпочитани за остеодиференциация. Морфологично открихме, че върху произволно конфигурирани нановлакна клетките развиват звездообразна морфология с множество израстъци; обаче, с времето се наблюдаваха значително по-малко клетъчни движения. Обратно, удължена клетъчна форма с удължен актинов цитоскелет, са придружени със значително повишена клетъчна мобилност, и се наблюдава, когато клетките се прикрепят към подредени нановлакна. Освен това, ясна тенденция за по-висока активност на алкална фосфатаза също е открита върху подредените влакна, когато ADMSCs са култивирани с остеогенна индукционна среда. Най-силното натрупване на Ализарин ред (AR) и оцветяване по фон Коса при 21 дни култивиране в остеогенна среда е открито върху 3-D подредени влакна, докато останалите показват по-ниска и доста по-слаба активност. Количественият анализ на полимеразната верижна реакция за Osteopontin (OSP) и RUNX 2 като цяло потвърждава тази тенденция, показвайки повишена експресия на активността на остеогенните гени в 3-D среда, особено върху подредени нановлакна.

Г12. B. Vasileva, D. Staneva, N. Krasteva, G. Miloshev and M. Georgieva (2021) Changes in chromatin organization eradicate cellular stress resilience to irradiation with UVA/B light and induce premature ageing, *Cells*, 10(7): 1755.

Резюме: Сложните взаимодействия между ДНК и ядрените протеини поддържат организацията и стабилността на генома. Ядрените протеини, особено хистоните, организират, уплътняват и запазват стабилността на ДНК, но също така позволяват нейната динамична реорганизация винаги, когато ядрените процеси изискват достъп до нея. Съществуват пет хистонови класа и те са еволюционно запазени сред еукариотите. Свързващите хистони са пети клас и с течение на времето ролята им в хроматина е била пренебрегвана. Линкерните хистони взаимодействат с ДНК и другите хистони и по този начин поддържат стабилността на генома и ядрената организация. *Saccharomyces cerevisiae* е брилянтен модел за изследване на линкерни хистони, тъй като генът за него е един. Ето защо ние създадохме шам на дрожди без линкерен хистон, използвайки нокаут на съответния ген и проследихме начина, по който клетките стареят хронологично. Тук представяме нашите резултати, демонстриращи, че променената динамика на хроматина по време на хронологичния живот на дрождевите клетки с мутация в ARP4 (свързания с

актин протеин 4) и без гена HNO1 за линкерния хистон води до силни промени в профилите на генната експресия на подгрупа от гени, участващи в възстановяването на ДНК и автофагията. Получените резултати допълнително доказват, че дрождевите мутанти имат намалена преживяемост при UVA/B облъчване, вероятно поради ускореното разграждане на хроматина и нарушена пролиферация. Нашата хипотеза предполага, че структурата на хроматина от по-висок порядък и взаимодействията между хроматиновите протеини са от решаващо значение за поддържането на организацията на хроматина по време на хронологично стареене при оптимални и UVA-B стресови условия.

Г13. М. Keremidarska, К. Hristova, Т. Hikov, Е. Radeva, Д. Mitev, I. Tsvetanov, R. Presker, D. Drobne, В. Drašler, S. Novak, V. Kononenko, К. Eleršič, L. Pramatarova and N. Krasteva. (2015) Development of Polymer/Nanodiamond Composite Coatings to Control Cell Adhesion, Growth and Functions In: *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*. Elsevier. Eds: A. Iglič, Ch.V. Kulkarni, M. Rappol., 21, 1-26 -book chapter.

Резюме: Идентифицирането на биоматериали, които поддържат подходящо клетъчно прикрепване, пролиферация и функции, е от решаващо значение за тъканното инженерство и клетъчната терапия. Има нарастващ интерес към функционални органични/неорганични композити, където малко количество материал с наноразмери подобрява физикохимични свойства и оттук прикрепването, растежа и диференцирането на клетките. В тази работа приготвихме полимерни/нанодиамаантни композитни слоеве на базата на хексаметилдисилоксан и детонационни нанодиамаантени (DND) частици, в които частиците бяха или вградени в полимера, или отложени върху предварително образувания плазмено-полимеризиран (PP) слой. Изследвани са повърхностните свойства на композитите, като грапавост и омокряемост, както и адхезията, растежа и функциите на остеосаркомните MG-63 клетки и първичните мезенхимни стволови клетки от плъх. Целта ни беше да проучим влиянието на методите на вграждане на DND в полимера върху свойствата на повърхността на материала и клетъчния отговор, за да бъдат контролирани чрез манипулиране на композитни повърхности, съдържащи диаманти. Открихме разлики между двата композита по отношение на техните физикохимични свойства и клетъчното поведение, което предполага, че методът на включване на частиците в полимери трябва да се вземе предвид по време на разработването на нови биоматериали за специфично приложение.