



**ИБФБМИ**

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ  
Институт по биофизика и биомедицинско инженерство  
Секция „Липид-белтъчни взаимодействия“

---

Даяна Славчова Бенкова

**БИОЛОГИЧНА АКТИВНОСТ НА ХИТОЗАН-БАЗИРАНИ  
НАНОМАТРИАЛИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен  
„ДОКТОР“

Област на висше образование

*„Природни науки, математика и информатика“*

Професионално направление *„Биологически науки“*

Докторска програма *„Биофизика“*

Научни ръководители:

Проф. д-р Галя Станева

Доц. д-р Анелия Костадинова

София, 2026

Дисертационният труд съдържа 149 страници и е онагледен с 59 фигури. Цитирани са 182 литературни източници.

Експерименталната работа е извършена основно в лабораториите на секция "Липид-белтъчни взаимодействия", Институт по Биофизика и биомедицинско инженерство към БАН. Микробиологичните изследвания са проведени в лабораториите на департамент „Микология“, Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ към БАН със съдействието на доц. д-р Екатерина Крумова и нейния колектив.

Изследваните наноматериали са синтезирани, охарактеризирани и предоставени от д-р Хишам Елшоки и неговия научен колектив от Централна лаборатория за нанотехнологии и модерни материали и Регионален център за храни и фуражи към Агрикултурния изследователски център, Гиза, Египет.

Дисертационният труд е представен и обсъден на разширен научен семинар на секция „Липид-белтъчни взаимодействия“ към Институт по биофизика и биомедицинско инженерство – БАН, проведено на 07.04.2026 г.

## Съдържание:

I. Увод .....	5
II. Цел и задачи .....	5
III. Използвани методи.....	8
IV. Резултати .....	9
IV.1. Характеристики на NMs.....	9
IV.1.1. Характеристики на NMs за моделни мембрани .....	9
IV.1.2. Характеристики на CS-базираните HNCs за фитопатогенните гъби .....	10
IV.1. Взаимодействия на наноматериалите с моделни мембрани .....	11
IV.1.1. Количествени промени в липидната подреденост на LUVs .....	11
V.1.1. Промени в липидната подреденост на EggPC/Chol LUVs, модел на Lo фаза .....	11
IV.2.2. Промени в средния размер, полидисперсност и $\zeta$ -потенциал на EggPC LUVs.....	16
IV.2.3. Морфологични промени на GUVs, индуцирани от NMs .....	18
IV.3. Биоактивност на CS-базираните HNCs срещу фитопатогенни гъби - <i>A. solani</i> и <i>F. solani</i> .....	22
IV.3.1. Антифунгална активност на CS-базираните HNCs .....	22
IV.3.2. Маркери за оксидативен стрес .....	24
V. Дискусия.....	28
V.1. Взаимодействия между CS-базирани и PEG-базирани HNCs с мембранни модели, имитиращи фазовата хетерогенност на еукариотните клетъчни мембрани.....	28
V.1.1. Ефекти на NMs върху липидната подреденост на хомогенни и хетерогенни фази .....	28
V.1.2. Промени в колоидните характеристики на мембранни модели, индуцирани от NMs .....	30
V.1.3. Морфологични промени в хомогенни и хетерогенни мембрани, индуцирани от NMs .....	32
V.2. Биоактивност на CS-базираните HNCs срещу фитопатогенни гъби <i>A. solani</i> и <i>F. solani</i> .....	34
V.2.1. Антифунгална активност на CS-базираните HNCs. Ефекти върху <i>A. solani</i> и <i>F. solani</i> .....	34
V.2.2. Механизъм на антифунгална активност на CS-базираните HNCs .....	35
VI. Заключение.....	40
VII. Приноси .....	45

## **Използвани съкращения**

**AA** (acetic acid) – оцетна киселина

**Chol** (cholesterol) – холестерол

**CS** (chitosan) – хитозан

**DLS** (dynamic light scattering) -динамично светлинно разсейване

**DI-H<sub>2</sub>O** – дейонизирана вода

**ddH<sub>2</sub>O** – двойно дестилирана вода

**EggPC** (egg phosphatidylcholine) – яйчен фосфатидилхолин

**EggSM** (egg sphingomyelin) – яйчен сфингомиелин

**ELS** (electrophoretic light scattering)– електрофоретично светлинно разсейване

**GP** (general polarization) – обща поляризация

**GUVs** (giant unilamellar vesicles) – гигантски униламеларни везикули

**HNCs** (hybrid nanocomposites)– хибридни нанокompозити

**HRTEM** (high resolution transmissive electron microscopy) – трансмисионна електронна микроскопия с висока разделителна способност

**L<sub>a</sub>** (liquid disordered) – течно-неподредена фаза

**L<sub>o</sub>** (liquid ordered) – течно-подредена фаза

**LUVs** (large unilamellar vesicles) – големи униламеларни везикули

**MDA** (malondialdehyde) – малондиалдехид

**NMs** (nanomaterials) – наноматериали

**NPs** (nanoparticles) – наночастици

**OS** (oxidative stress) – оксидативен стрес

**PC** (phosphatidylcholine) – фосфатидилхолин

**PCC** (protein carbonyl content) – протеинови карбонили

**PEG** (polyethylene glycol) – полиетилен гликол

**ROS** (reactive oxygen species) – реактивни кислородни видове

**SOD** (superoxide dismutase) – супероксидна дисмутаза

## I. Увод

Нанотехнологиите са едни от най-прогресивно развиващите се направления в съвременната наука и индустрия. Ценността на наноматериалите се крие в техните малки размери, голямо съотношение повърхност-към-обем, реактивна повърхност и морфология. Това им придава отличителни физикохимични свойства, обуславящи разнообразни потенциални приложения. Съвременните научни изследвания са насочени към разработването на все по-сложни в структурно отношение хибридни нанокompозити с органични и неорганични компоненти с цел подобряване на техните свойства и активности. Като органичен компонент често се използват различни полимери като синтетичния полиетиленгликоълът и полусинтетичния хитозан, поради отличната им биосъвместимост, ниска токсичност и имуногенност. Комбинирането им с неорганична фаза (често биоактивни неорганични оксиди) е целенасочена стратегия за получаване на синергични свойства и активност за целенасочени приложения от биомедицината до селското стопанство.

Хибридните наноматериали, съдържащи хитозан или полиетиленгликол в комбинация с неорганични оксиди като ZnO и CuO, SiO<sub>2</sub>, се разглеждат като перспективни материали с биомедицински приложения, включително в диагностиката, като системи за контролирано доставяне на биоактивни вещества и в противотуморни терпии. Тяхната ефективност по отношение на клетъчното поемане и интернализацията е тясно свързана с начина, по който тези наноматериали взаимодействат с клетъчната мембрана. Клетъчните мембрани представляват сложни и хетерогенни структури по отношение на своя липиден и белтъчен състав. Редица изследвания обаче, се фокусират върху белтъчните компоненти, подценявайки ролята на липидната бислоя в процесите на взаимодействие и поемане на наноматериали от клетките. Липидите са основен структурен и функционален компонент на биологичните мембрани, които формират различни липид-белтъчни домени с определен размер, липиден състав и фазово състояние. Директното взаимодействие на наноматериалите с липидните молекули и различните липидни фази може да предизвика изменения в биофизичните и физикохимичните характеристики на мембрания бислоя. Анализът на тези изменения могат да бъдат използвани за извеждане ключови механизми по отношение на клетъчно поемане, мембранно проникване, степента на биосъвместимост, както и взаимовръзката между характеристиките на наноматериалите и тяхната ефективност. Въз основа на изложеното се формулира една от целите на настоящия дисертационен труд, а именно разкриване на основни принципи на взаимодействие между хитозан-базирани и полиетиленгликол-базирани хибридни нанокompозити, съдържащи ZnO и CuO, SiO<sub>2</sub> с мембранни модели, възпроизвеждащи както липидния състав и трите основни фазови състояния на клетъчната мембраната – течно-неподредена (L<sub>d</sub>), течно-подредена (L<sub>o</sub>) и състояние на фазово ко-съществуване (L<sub>d</sub>/L<sub>o</sub>). Изясняването на такива механизмите създава

предпоставки за целенасочена оптимизация на наноматериалите като „умни“ лекарствени носители с минимална нанотоксичност.

Освен в биомедицината, такива полимер-базирани хибридни нанокomпозити намират широко приложение в селското стопанство като ефективни и екологично съвместими нанопестициди. Съвременното земеделие е изправено пред сериозни предизвикателства, свързани с нарастващата резистентност на фитопатогените и широката употреба на синтетични, често токсични пестициди. Тези проблеми налагат разработването на нови, екологично съвместими и устойчиви решения. В този контекст, хитозан-базираните хибридни нанокomпозити с CuO, ZnO и SiO<sub>2</sub> се разглеждат като обещаващи кандидати за нанопестициди. Както хитозанът, така и неорганичните оксиди проявяват изразена антифунгална активност, а комбинирането им в хибридни системи представлява иновативен подход за повишаване на ефективността. Въз основа това втората цел от настоящия дисертационен труд е насочена към установяване на пестицид-подобни активности на хитозан-базирани хибридни нанокomпозити с ZnO и CuO, SiO<sub>2</sub> срещу едни от най-важните фитопатогенните в селското стопанство, *Alternaria solani* и *Fusarium solani*. Тези патогени са сред основните причинители на значителни загуби при култури като домати, картофи и соя, както по време на вегетацията, така и след прибиране на реколтата. Изследвания върху мембранно-увреждащ и прооксидантен механизъм на действие на антифунгални наноматериали могат да положат научна основа за разработването на устойчиви и екологично съвместими нанопестициди в съвременното селско стопанство.

## II. Цел и задачи

**Първа цел:** Разкриване на принципите на взаимодействие между хитозан-базирани и полиетиленгликол-базирани хибридни нанокосопозити с мембранни модели, имитиращи липидната фазова хетерогенност на еукариотните мембрани.

За постигане на първата цел бяха поставени следните задачи:

- **Задача 1:** Формиране на големи униламеларни везикули (LUVs), съставени от едно-, дву- и трикомпонентни липидни смеси чрез метода на екструдирание. Изследване на промени в липидната подреденост в  $L_d$ ,  $L_o$  и  $L_d/L_o$  фазово съвместно съществуване, индуцирани от NMs, с помощта на Лаурдан флуоресцентна спектроскопия.
- **Задача 2:** Изследване на промените в колоидните характеристики на LUVs, третирани с NMs чрез DLS и ELS. Установяване на промени в повърхностния заряд, средния размер и полидисперсността на LUVs, индуцирани от NMs.
- **Задача 3:** Формиране на гигантски униламеларни везикули (GUVs) от едно- и трикомпонентни липидни смеси чрез метода на електроформиране. Наблюдаване на морфологични промени в  $L_d$  и  $L_d/L_o$  везикули, индуцирани от различни NMs, чрез фазово-контрастна и флуоресцентна микроскопия.

**Втора цел:** Изследване на антифунгалната активност на хитозан-базирани хибридни нанокосопозити, съдържащи ZnO, CuO, SiO<sub>2</sub>, срещу едни от най-важните фитопатогенни гъби – *Alternaria solani* и *Fusarium solani*.

За постигане на втората цел бяха поставени следните задачи:

- **Задача 1:** Микробиологично изследване на антифунгалната активност на хитозан-базирани хибридни нанокосопозити срещу *A. solani* и *F. solani* чрез агар-дифузионен метод. Визуално отчитане на формираните инхибиторни зони и отчитане на степента на антифунгална активност.
- **Задача 2:** Оценка на прооксидантната активност на тестваните хитозан-базирани хибридни нанокосопозити. Измерване на нивата на оксидативен стрес във фунгалните клетки след третиране, отчитани посредством измерване на нивата на биомаркерите на оксидативен стрес
- **Задача 3:** Изследване на количествените промени в липидната подреденост на мембраните на фунгалните клетки след третиране с хитозан-базирани хибридни нанокосопозити чрез Лаурдан флуоресцентна спектроскопия.

### **III. Използвани методи**

- 1.** Приготвяне на дисперсии от наноматериали.
  - 1.1.** Приготвяне на дисперсии от наноматериали за моделни мембрани в 1% оцетна киселина (acetic acid – AA) в двойно дестилирана вода (ddH<sub>2</sub>O).
  - 1.2.** Приготвяне на дисперсии от наноматериали за фитопатогенни гъби в 0.2% диметил сулфоксид (Dimethyl sulphoxide - DMSO).
- 2.** Формиране на големи униламеларни везикули (Large unilamellar vesicles - LUVs) чрез метода на екструдирание. Формиране на LUVs от четири вида липидни смеси: яйчен фосфатидилхолин (egg phosphatidylcholine - EggPC) за модел на L<sub>d</sub> фаза, яйчен сфингомиелин (egg sphingomyelin - EggSM) и холестерол (Chol) (1/1) за модел на рафт-подобна L<sub>o</sub> фаза, EggPC/Chol (1/1) за модел на L<sub>o</sub> фаза и EggPC/EggSM/Chol за модел на L<sub>d</sub>/L<sub>o</sub> фазово съвместно съществуване.
- 3.** Формиране на гигантски униламеларни везикули (Giant unilamellar vesicles – GUVs) чрез електроформация. Формиране на GUVs от два вида липидна смеси – EggPC за модел на L<sub>d</sub> фаза и Egg/EggSM/Chol за модел на L<sub>d</sub>/L<sub>o</sub> фазово съвместно съществуване.
- 4.** Лаурдан флуоресцентна спектроскопия.
- 5.** Светлинно разсейване - Динамично светлинно разсейване (Dynamic light scattering – DLS) и Електрофоретично светлинно разсейване (Electrophoretic light scattering - ELS).
- 6.** Оптична микроскопия – Фазово-контрастна микроскопия и флуоресцентна микроскопия.
- 7.** Дифузия на агар.
- 8.** Спектрофотометрично определяне на маркери за оксидативен стрес чрез измерване на абсорбция:
  - 8.1.** Определяне на нивата на активна супероксидна дисмутаза (Superoxide dismutase – SOD) чрез метода на Луори и чрез боята нитро син тетразолий (Nitro Blue Tetrazolium, NBT).
  - 8.2.** Определяне на нивата на малондиалдехид (malondialdehyde - MDA) чрез кит за липидна пероксидация с тиобарбитурова киселина (thiobarbituric acid, TBA).
  - 8.3.** Определяне на нивата на протеинови карбонили (Protein carbonyl content – PCC) чрез кит с 2,4-динитрофенилхидразин (2,4-Dinitrophenylhydrazine – DNPH).
- 9.** Статистика - Shapiro–Wilk Normality-test, One-way Anova с Tuckey post-hoc test.

## IV. Резултати

### IV.1. Характеристики на наноматериалите

Колоидните характеристики (средни размери и стойности на  $\zeta$ -потенциал) на изследваните наноматериали (nanomaterials – NMs) бяха измерени с помощта на DLS и ELS. Морфологията на NMs бе визуализирана чрез трансмисионна електронна микроскопия с висока разделителна способност (High-Resolution Transmission Electron Microscopy – HRTEM).

#### IV.1.1. Характеристики на наноматериалите за моделни мембрани

Колоидните характеристики са измерени върху дисперсии от NMs в ddH<sub>2</sub>O. От получените DLS профили се установява, че хитозановите (CS) наночастици (NPs) имат най-малък среден размер (хидродинамичен диаметър) от 38 nm и най-висока стойност на  $\zeta$ -потенциала от +33.5 mV (табл. 1). Хитозан-базираните хибридни нанокompозити (HNCs) показват следните характеристики: CS-CuO - 334.3 nm и +16.1 mV, CS-SiO<sub>2</sub> - 770 nm и 17.7 mV, CS-ZnO - 438 nm и 21.6 mV. Установява се ясна тенденция към увеличаване на средния хидродинамичен размер и намаляване на повърхностния заряд при комбиниране на полимера със съответните метални оксиди. Най-голям размер от 1116 nm и най-нисък потенциал от +9.48 mV са измерени при PEG-ZnO HNCs.

От получените HRTEM изображения се установява, че CS NPs притежават сферична форма с размери от 20 до 40 nm (фиг. 1), което съответства на размерите в DLS профила им (табл. 1). Хибридните нанокompозити от CS-CuO и CS-SiO<sub>2</sub> се визуализират като сферични агломерати между полимера и оксидите с характерни размери съответно от 10 - 20 nm и 150 - 200 nm. При CS-ZnO и PEG-ZnO HNCs се наблюдават сходни размери от 100 nm и 90 nm (фиг. 1), както и сходна морфология - сферично ядро от ZnO, обгърнато с полимерен слой от CS и PEG, съответно (фиг. 1). При всички HNCs се забелязва вариация между техните средни размери в DLS профилите им и тези получени от HRTEM, което вероятно се дължи на настъпилата агрегация, след тяхното диспергиране.

HNCs	$\zeta$ – потенциал (mV)	DLS средни размери (nm)	HRTEM размери (nm)
CS NPs	+33.5 ± 5.8	38 ± 14	30 ± 9
CS-ZnO HNCs	+17.7 ± 7.5	438 ± 7	100 ± 13
CS-CuO HNCs	+16.1 ± 4.2	334 ± 25	15 ± 5
CS-SiO <sub>2</sub> HNCs	+21.6 ± 7.2	770 ± 10	175 ± 16
PEG-ZnO HNCs	+9.5 ± 4.4	1116 ± 12	90 ± 11

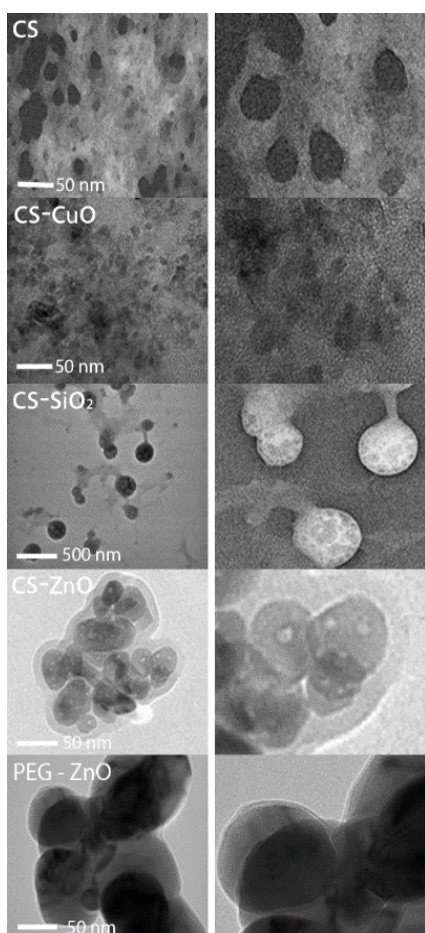
Таблица 1: Характеристики на NMs: стойности на  $\zeta$ -потенциал, DLS средни размери и HRTEM размери.

#### IV.1.2. Характеристики на хитозан-базираните хибридни нанокomпозити за фитопатогенните гъби

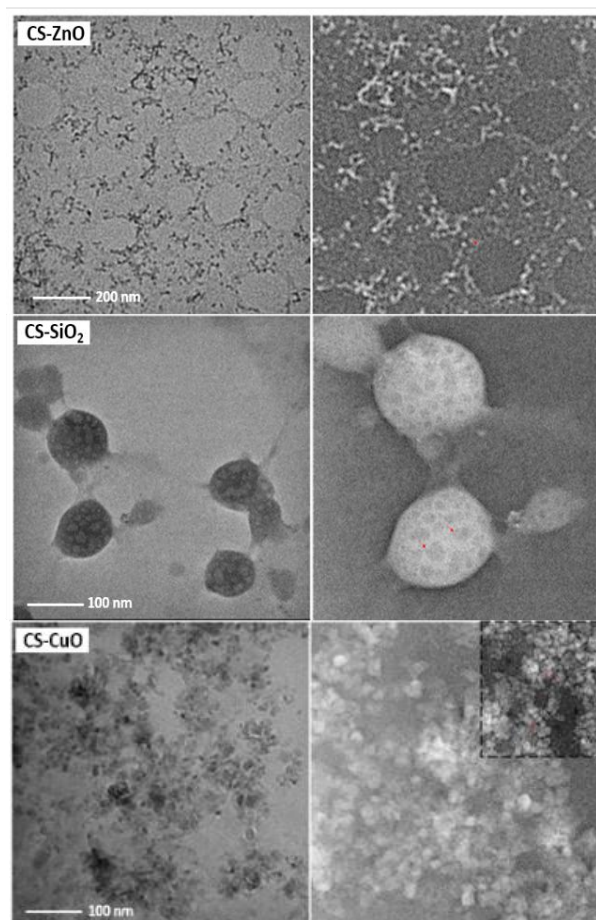
Колоидните характеристики са измерени върху дисперсии от CS-базираните HNCs в 0.2% DMSO. Получените средни размери и стойности на  $\zeta$ -потенциала на HNCs са следните: CS-ZnO - 167 nm и +22.5 mV, CS-CuO - 65 nm и +21.7 mV, CS-SiO<sub>2</sub> - 76 nm и + 30 mV (табл. 2). От HRTEM изображенията се установява, че CS-SiO<sub>2</sub> и CS-CuO HNCs са под формата на сферични агломерати с размери от 85 nm и 55 nm, съответно (фиг. 2). Хибридният нанокomпозит от CS-ZnO показва специфична морфология от агломерирано ядро от CS, обгърнато със слой от ZnO, с характерни размери от 120 nm (фиг. 2).

HNCs	$\zeta$ – потенциал (mV)	DLS средни размери (nm)	HRTEM размери (nm)
CS-ZnO HNCs	+ 23.5 ± 5.5	167 ± 6	120 ± 11
CS-CuO HNCs	+ 21.7 ± 7.5	65 ± 4	55 ± 5
CS-SiO <sub>2</sub> HNCs	+ 30 ± 7.2	76 ± 5	85 ± 8

**Таблица 2:** Характеристики на CS-базираните HNCs: стойности на  $\zeta$  - потенциал, DLS средни размери и HRTEM размери.



**Фигура 1:** Морфология и размери на NMs, визуализирани чрез HRTEM.



**Фигура 2:** Морфология и размери на CS-базираните HNCs, визуализирани чрез HRTEM.

## IV.2. Взаимодействия на наноматериалите с моделни мембрани

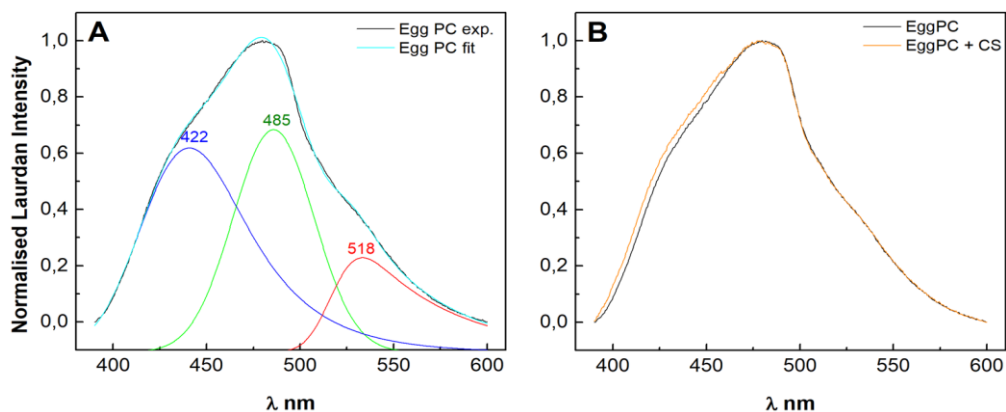
### V.2.1. Количествени промени в липидната подреденост на LUVs

#### V.2.1.1. Промени в липидната подреденост на EggPC LUVs, модел на $L_d$ фаза

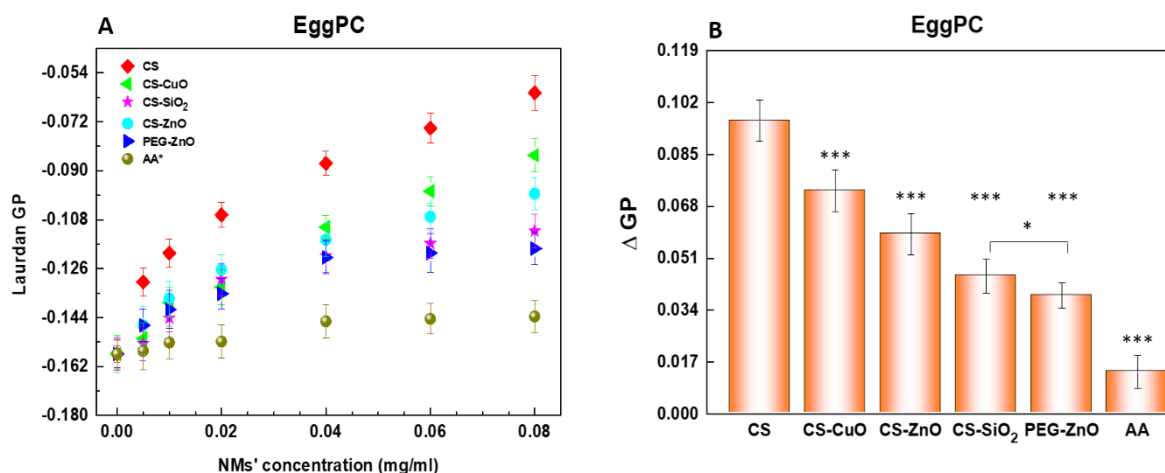
Фосфатидилхолинът (phosphatidylcholine - PC) е цвитерйонен глицерофосфолипид и е най-разпространеният липиден вид в еукариотната клетъчна мембрана. При физиологична температура липидът формира мембрани в течно-неподредена (liquid-disordered –  $L_d$ ) фаза поради наличието на полиненаситената си мастна киселина на *sn*-2 позиция. За изследване на ефекта на NMs върху липидната подреденост се използват Лаурдан флуоресцентна спектроскопия и големи униламеларни везикули (large unilamellar vesicles – LUVs) като мембранни модели. Всички NMs се добавят към LUVs дисперсията по асиметричен начин, така че взаимодействията между NMs и везикулите да се осъществяват откъм външния монослой на мембраната. На фигура 3А е показан нормализираният емисионен спектър на лаурдана в чистите LUVs от яйчен фосфатидилхолин (egg phosphatidylcholine - EggPC) (без NMs). След деконволюция на спектъра бяха разграничени три емисионни пика с различен интензитет. Емисионният спектър на лаурдана в EggPC LUVs показва най-висок интензитет и е центриран при 485 nm (зелена крива), което е индикация, че липидите са в  $L_d$  фаза. Другите два пика с по-нисък интензитет са центрирани при 422 nm (синьо изместване) и 518 nm (червено изместване) (фиг. 3А). Тези резултати показват, че лаурдановата молекула е чувствителна към поне три различни микросреда в мембраната. Флуорофорът се локализира в областта на глицероловия скелет на липидите [1, 2]. Флуоресценцията на лаурдана при различни дължини на вълните отразява различна дълбочина в липидната биомембрана. По-късите дължини на вълните се излъчват, когато Лаурдана се намира по-дълбоко в мембраната, докато по-дългите дължини на вълните се излъчват, когато флуорофорът е разположен по-близо до водния интерфейс. Конформационните промени в глицероловия скелет, особено свързани с неговата хидратация, както и преориентацията на липидните глави, зависят от позицията и ориентацията на *sn*-1 и *sn*-2 мастните вериги [1, 2]. На фиг. 3В графично е представен емисионният спектър на третираните EggPC LUVs с 0.01 mg/ml CS NPs. Забелязва се емисионно изместване към по-късите дължини на вълните. Това изместване е индикация за намаляване на полярността около глицероловия скелет на EggPC и увеличаване на липидната подреденост в тази област на липидния бислой.

Контролната стойност на общата поляризация (general polarization - GP) на чистите EggPC LUVs е отрицателно число (-0.1537) (фиг. 4А), показващо, че бислоя на везикулите е в  $L_d$  фаза. Добавянето на NMs към EggPC LUVs предизвиква концентрационно-зависимо увеличаване на GP стойностите (фиг. 4А), показателно за увеличаване на липидната подреденост. Най-силен ефект се наблюдава при CS NPs, а най-слаб при PEG-ZnO HNCs. Тъй като CS-базираните HNCs са приготвени в 1% воден разтвор на оцетна киселина (acetic acid – AA), ефектът на киселината се тества в същите процентни концентрации, равни на тези в

съответните NMs/EggPC LUVs дисперсии – 0.005 mg/ml (0.005% AA), 0.01 mg/ml (0.01% AA), 0.02 mg/ml (0.02% AA), 0.04 mg/ml (0.04% AA) и 0.08 mg/ml (0.08% AA). Установява се, че AA също увеличава липидната подреденост, но този ефект е значително по-слаб в сравнение с всички тествани NMs (фиг. 4A).



**Фигура 3:** Спектър на чисти EggPC и третираните с CS LUVs: А) Деконволюция на експерименталния лаурданов спектър (черна крива) чрез три Гаусови пика – син при 422 nm, зелен при 485 nm и червен при 518 nm. Сумата от тези три пика дава пика в светло синьо. В) Лаурданов спектър на третираните с CS EggPC LUVs (0.01 mg/ml) (оранжева крива), изместен към по-ниската дължина на вълната спрямо контролата (черна крива). Това демонстрира по-висока липидна подреденост в сравнение с контролните EggPC LUVs без CS. Измерванията са проведени при температура от 37°C.



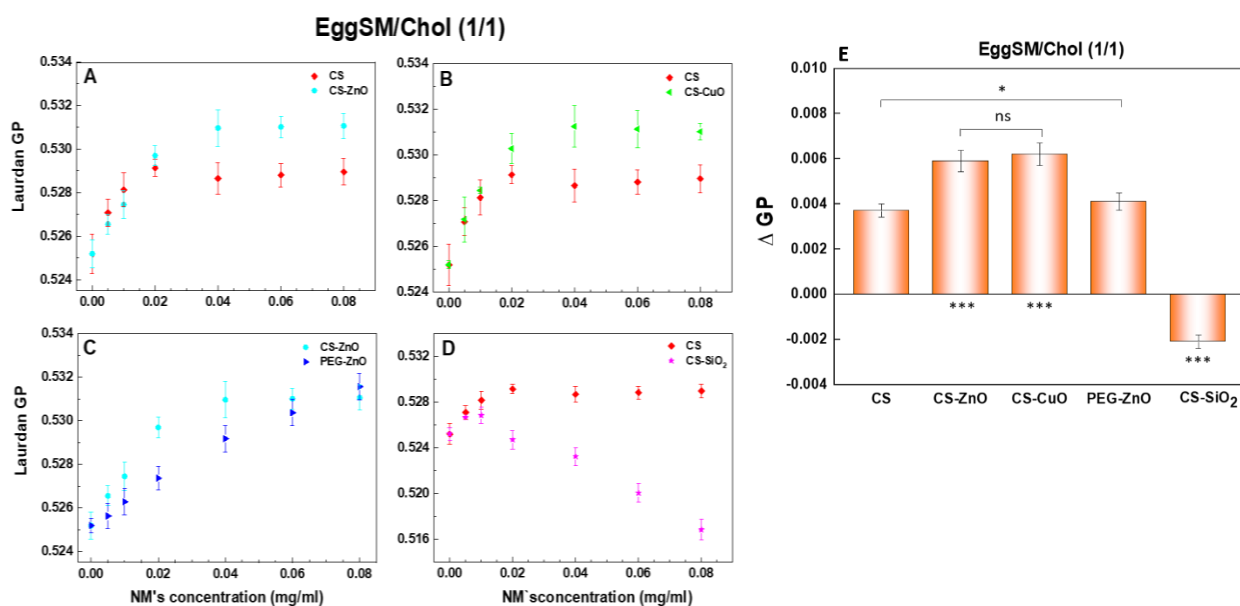
**Фигура 4:** Лаурдан GP на EggPC LUVs като функция на концентрацията на NMs, измерена при 37°C. А) Отрицателна стойност на GP за EggPC LUVs (-0,1537), индикатор за мембрани в  $L_d$  фаза. Прогресивно повишаване на GP стойностите с увеличаване на концентрацията на NMs. В)  $\Delta GP = GP(0.08 \text{ mg/ml}) - GP(0 \text{ mg/ml})$  изразява количествените промени в зависимост от вида на NMs. Стойностите на GP за AA се измерват в процентните концентрации, равни на тези в съответните EggPC LUVs/NMs дисперсии: 0.005, 0.01, 0.02, 0.04 и 0.08 % AA (\*). Стандартните отклонения (Standard Deviations – SDs) на GP са получени от три независими експеримента с четири измервания на проба. Статистическата значимост се изразява с: \*\*\*  $p < 0.001$  (при сравняване на CS NPs с всички CS-базирани HNCs и между CS-базирани HNCs), \*  $p < 0.05$  (при сравняване на CS-SiO<sub>2</sub> с PEG-ZnO HNCs).

На фигура 4В са представени количествените промени в липидната подреденост като функция от вида на тестваните NMs. С  $\Delta GP$  се изразява разликата между най-високата GP стойност (в този случай при концентрация от 80  $\mu\text{g/ml}$ ) и контролната GP стойност.

Количествените промени в липидната подреденост в  $L_d$  фазата, индуцирани от NMs, са в следния низходящ ранг: CS > CS-CuO > CS-ZnO > CS-SiO<sub>2</sub> > PEG-ZnO. Резултатите от проведените експерименти показаха, че след инкубация на моделите и с NMs (10 min) GP стойностите на дисперсията NMs/EggPC LUVs остават непроменени за още 20 min. Следователно получените GP стойности (и  $\Delta GP$ ) представляват средни стойности за целия мембранен бислой, като обхващат всички промени, настъпили както във външния, така и във вътрешния монослой.

#### IV.2.1.2. Промени в липидната подреденост на EggSM/Chol LUVs, модел на raft-подобна $L_o$ фаза

Бинарната смес от яйчен сфингомиелин (egg sphingomyelin – EggSM) и холестерол (cholesterol – Chol) в съотношение 1/1 се използва като модел на течно-подредена (liquid-ordered –  $L_o$ ) фаза на raft-подобни домени в еукариотната клетъчна мембрана. Контролната GP стойност на тези модели е висока и положителна стойност (0.5252), отразяващо бислой с висока липидна подреденост и ниска полярност (фиг. 5A, B, C и D). При CS NPs и CS-базираните HNCs се наблюдава повишаване на GP стойностите при концентрации до 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (фиг. 5A, B, C и D). При по-високите концентрации не се наблюдават значими промени в липидната подреденост на везикулите. Единствено при PEG-ZnO HNCs се наблюдава изразен концентрационно-зависим ефект (фиг. 5C).



**Фигура 5:** Лаурдан GP на EggSM/Chol LUVs като функция от концентрацията на NMs, измерени при 37°C. Контролната GP стойност на EggSM/Chol (1/1) е 0.5252, показател за мембрани в  $L_o$  фаза. Сравнение на ефектите на: A) CS NPs с CS-ZnO; B) CS NPs с CS-CuO; C) PEG-ZnO с CS-ZnO; D) CS NPs с CS-SiO<sub>2</sub>. E) Лаурдан  $\Delta GP$  на EggSM/Chol (1/1) LUVs в зависимост от вида на NMs.  $\Delta GP = GP(0.04 \text{ mg/ml}) - GP(0 \text{ mg/ml})$ . Статистическата значимост се изразява с: \*\*\* $p < 0.001$  (при сравняване на CS NPs с CS-ZnO, CS-CuO с CS-SiO<sub>2</sub>; CS-ZnO с PEG-ZnO и PEG-ZnO с CS-SiO<sub>2</sub>), \* $p < 0.05$  (при сравняване на CS NPs с PEG-ZnO). C “ns” (not significant) се обозначава липса на статистическа разлика (при сравнение на CS NPs с PEG-ZnO).

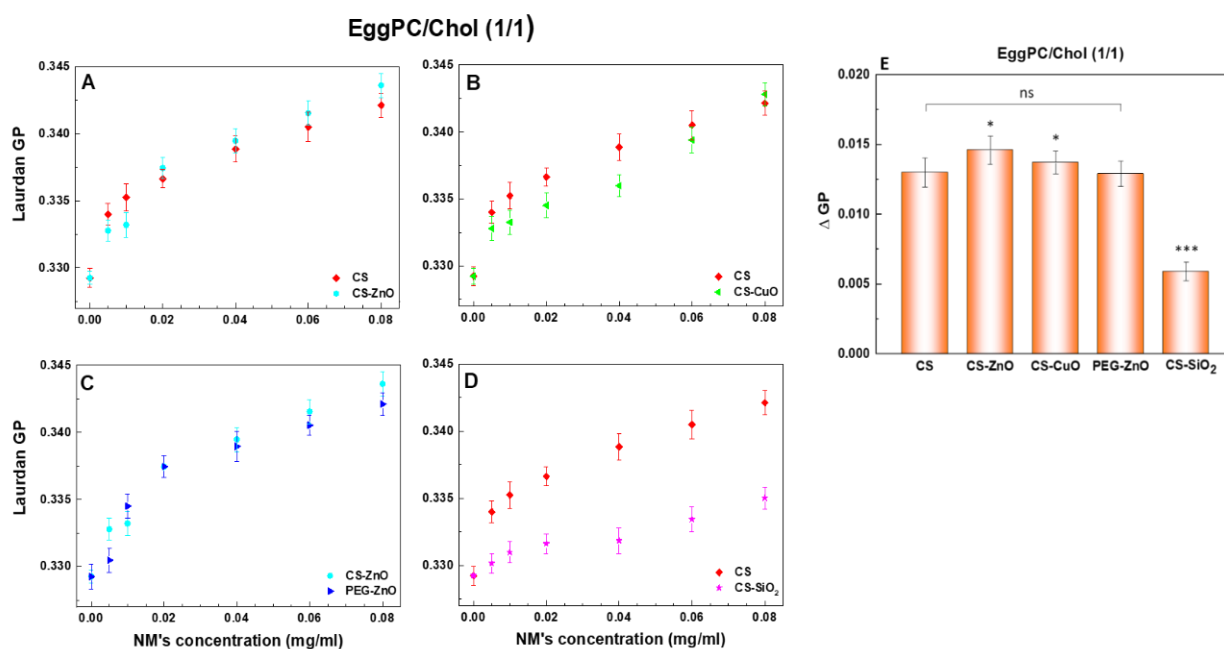
Хибридният наноккомпозит от CS-SiO<sub>2</sub> показва по-различна тенденция на взаимодействие с рафт-подобната L<sub>o</sub> фаза. При ниските концентрации от 5 до 10 µg/ml се наблюдава слабо повишаване на липидната подреденост. С всяко последващо увеличаване на концентрацията на CS-SiO<sub>2</sub>, GP стойностите експоненциално намаляват - показател за флуидизиращ ефект на този наноккомпозит (фиг. 5D).

За да се изобразят количествените промени в рафт-подобната L<sub>o</sub> фаза, ΔGP е изчислен като разлика между GP стойностите при концентрация от 40 µg/ml и контролната GP стойност (фиг. 5E). В този случай се избира 40 µg/ml, тъй като над тази концентрация не се наблюдават значими промени. Установява се, че количествените промени на липидната подреденост в рафт-подобната L<sub>o</sub> фаза са два пъти по-малки от тези в L<sub>d</sub> фазата (фиг. 5B, фиг. 4). Върху рафт-подобния модел най-големи и сходни ефекти се установяват при CS-ZnO и CS-CuO HNCs. Наноккомпозитът PEG-ZnO и чистите CS NPs, от своя страна, индуцират по-слаби промени (фиг. 5E). Единствено CS-SiO<sub>2</sub> показват противоположен ефект. При този тип NMs се установява увеличаване на полярността в бислоя, показател за флуидизиращ ефект. Количествените промени в липидната подреденост в рафт-подобната L<sub>o</sub> фаза, индуцирани от NMs, следват посочения низходящ ранг: CS-CuO ≈ CS-ZnO > PEG-ZnO > CS > CS-SiO<sub>2</sub>.

#### **IV. Промени в липидната подреденост на EggPC/Chol LUVs, модел на L<sub>o</sub> фаза**

Бинарната смес от EggPC/Chol в съотношение 1/1 също служи за формиране на липиден модел в L<sub>o</sub> фаза. Контролната GP стойност на тези везикули е високо и положително число - 0.3293 (фиг. 6A, B, C и D). Следователно, бислоя на тези мембрани е в L<sub>o</sub>, а не в L<sub>d</sub> фаза. В сравнение с рафт-подобната L<sub>o</sub> фаза, EggPC/Chol L<sub>o</sub> фазата е по-неподредена, тъй като контролната GP стойност е по-ниска.

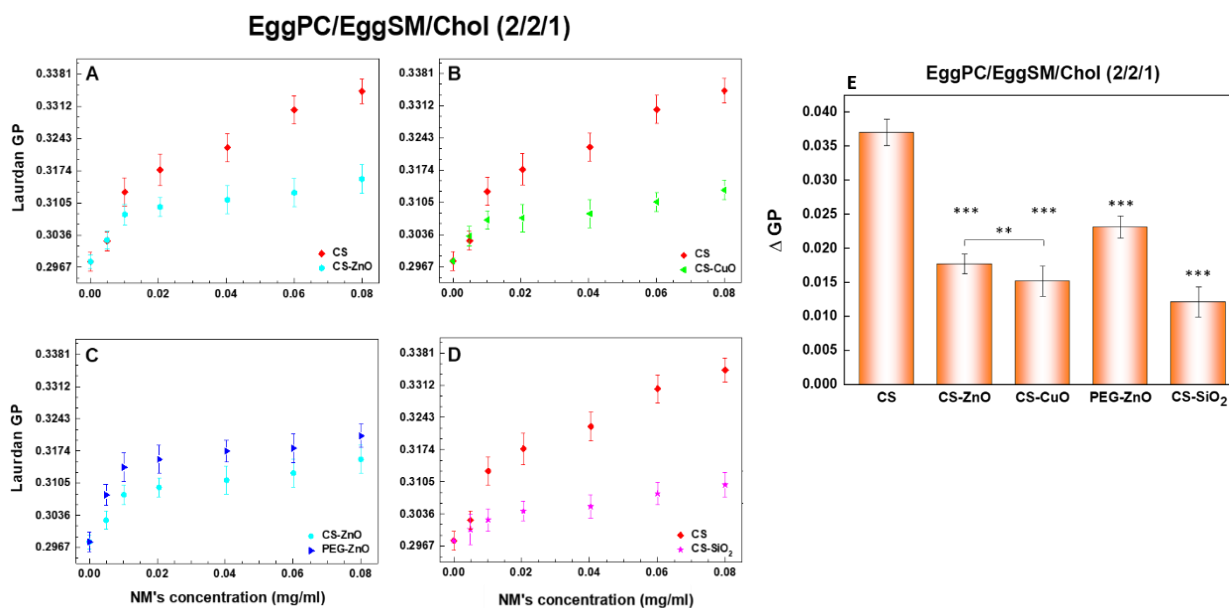
Всички тествани NMs показват концентрационно-зависимо увеличаване на подредеността в този модел (фиг. 6A, B, C и D). Подобно на рафт-подобната L<sub>o</sub> фаза, най-големи количествени промени се наблюдават при CS-ZnO и CS-CuO, последвани от CS NPs, PEG-ZnO и CS-SiO<sub>2</sub> (фиг. 6E). Това показва, че подреждащият ефект на NMs не е липид-специфичен. Количествените промени в липидната подреденост на EggPC/Chol L<sub>o</sub> фазата са пет пъти по-малки от тези в L<sub>d</sub> фазата (фиг. 4B) и три пъти по-големи от тези в рафт-подобната L<sub>o</sub> фаза (фиг. 5E). Количествените промени в липидната подреденост на EggPC/Chol L<sub>o</sub> фаза са в следния низходящ ранг: CS-ZnO > CS-CuO > CS ≈ PEG-ZnO > CS-SiO<sub>2</sub>.



**Фигура 6:** Лаурдан GP на EggPC/Chol LUVs като функция от концентрацията на NMs, измерени при 37°C. Контролната GP стойност на EggPC/Chol (1/1) е 0.3293, показател за мембрани в  $L_o$  фаза, но с по-ниска липидна подреденост в сравнение с рафт-подобната  $L_o$  фаза. Сравнение на ефектите на: A) CS NPs с CS-ZnO; B) CS NPs с CS-CuO; C) PEG-ZnO с CS-ZnO; D) CS NPs с CS-SiO<sub>2</sub>. E) Лаурдан  $\Delta GP$  на EggPC/Chol (1/1) LUVs в зависимост от вида на NMs.  $\Delta GP = GP(0.08 \text{ mg/ml}) - GP(0 \text{ mg/ml})$ . Статистическа значимост се изразява с: \*\*\*  $p < 0.001$  (при сравняване на CS NPs с CS-SiO<sub>2</sub>, CS-ZnO с PEG-ZnO и CS-SiO<sub>2</sub>, CS-CuO с PEG-ZnO и CS-SiO<sub>2</sub>), \*  $p < 0.05$  (при сравняване на CS NPs с CS-ZnO и CS-CuO, CS-ZnO с CS-CuO) и *ns* (при сравняване на CS NPs с PEG-ZnO).

#### IV.2.1.4. Промени в липидната подреденост на EggPC/EggSM/Chol LUVs, модел на $L_d/L_o$ фазово съвместно съществуване

Трикомпонентната смес от EggPC/EggSM/Chol в съотношение 2/2/1 е избрана за най-подходящ модел на еукариотната плазмена мембрана от всички модели в това изследване, поради липидния си състав и фазовата си хетерогенност. При физиологична температура в тези везикули се наблюдава фазово разделяне в бислоя - EggSM и Chol се организират в  $L_o$  фаза под формата на домени, заобиколени от непрекъснатата  $L_d$  фаза, съставена основно от EggPC. Всички тествани NMs оказват подреждащ ефект върху хетерогенния модел (Фиг. 7). Чистите CS NPs показват концентрационно-зависимо увеличаване на GP стойностите (фиг. 44A, B и C) и индуцират най-големите количествени промени в липидната подреденост (фиг. 44E). Ефектът на CS-базираните HNCs е много по-слаб в сравнение с чистите CS NPs (фиг. 7). Интересно наблюдение е, че върху хетерогенните LUVs PEG-ZnO HNCs показва по-силен ефект от другите хибридни NMs (фиг. 7C и E). Такива промени не се наблюдават в хомогенните  $L_d$  и  $L_o$  фази. Количествените промени в липидната подреденост в EggPC/EggSM/Chol LUVs в  $L_d/L_o$  съвместно съществуване, индуцирани от NMs, са изразени в следния низходящ ранг: CS > PEG ZnO > CS-ZnO > CS-CuO > CS-SiO<sub>2</sub>.



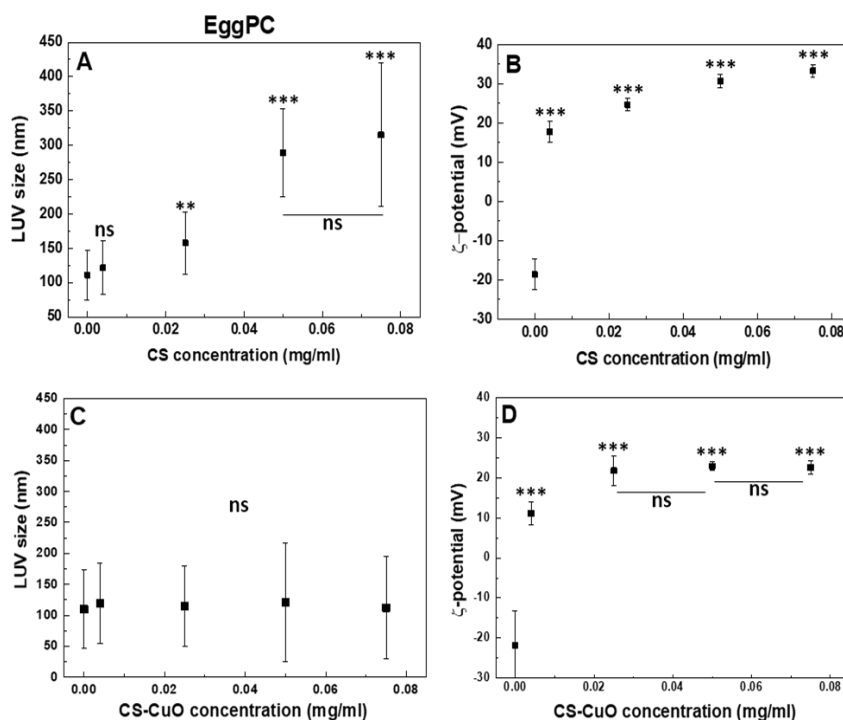
**Фигура 7:** Лаурдан GP на EggPC/EggSM/Chol LUVs като функция от концентрацията на NMs, измерени при 37°C. Контролната GP стойност на EggPC/EggSM/Chol (2/2/1) е 0.2976, показател за мембрани в  $L_d/L_o$  фазово съществуване. Сравнение на ефектите на: A) CS NPs с CS-ZnO; B) CS NPs с CS-CuO; C) PEG-ZnO с CS-ZnO; D) CS NPs с CS-SiO<sub>2</sub>. E) Лаурдан  $\Delta GP$  на EggPC/Chol (1/1) LUVs в зависимост от вида на NMs.  $\Delta GP = GP(0.08 \text{ mg/ml}) - GP(0 \text{ mg/ml})$ . Статистическата значимост се изразява с: \*\*\*  $p < 0.001$  (при сравняване на CS NPs с всички видове NMs, CS-ZnO с PEG-ZnO и CS-SiO<sub>2</sub>, CS-CuO с PEG-ZnO и CS-SiO<sub>2</sub>, PEG-ZnO с CS-SiO<sub>2</sub>), \*\*  $p < 0.05$  (при сравняване на CS-ZnO с CS-CuO).

#### IV.2.2. Промени в средния размер, полидисперсност и $\zeta$ -потенциал на EggPC LUVs

Промените в средния размер, полидисперсността и  $\zeta$ -потенциала на моделните мембрани, индуцирани от NMs, се оценяват с помощта на динамично светлинно разсейване (dynamic light scattering - DLS) и електрофоретично светлинно разсейване (electrophoretic light scattering – ELS). Тъй като най-големи промени в липидната подреденост бяха установени при  $L_d$  моделът от CS NPs и CS-CuO HNCs, на тези системи са изследвани колоидните характеристики на EggPC LUVs.

Средният диаметър на чистите EggPC LUVs е 110 nm (фиг. 8A и C) с полидисперсност от 50 до 150 nm, показваща хомогенна популация на везикули в дисперсионната среда (ddH<sub>2</sub>O, pH 5.5). DLS размерът на CS NPs е 38 nm (таб. 1), което е почти 9 пъти по-малко от CS-CuO HNCs с DLS размер от 334 nm (таб. 1). DLS размерите на EggPC LUVs са 3 пъти по-големи от тези на CS NPs и три пъти по-малки от тези на CS-CuO HNCs. Чистите LUVs имат  $\zeta$ -потенциал от -19 mV (фиг. 8B и D), което е индикатор за наличието на слаби електростатични сили на отблъскване между везикулите в дисперсионна среда. При pH 5.5 минимум 40% от аминокислотните групи на CS ще бъдат протонирани [3]. Взаимодействието между катионите CS NPs с отрицателно заредените EggPC LUVs довежда до агрегация на везикулите, отразена в концентрационно-зависимо увеличаване на средния везикулен диаметър и полидисперсност (фиг. 8A). Средният размер на

EggPC LUVs/CS NPs агрегатите достигат 312 nm с полидисперсност от 200 до 400 nm, изобразена в баровете на фиг. 8A. Тези барове изразяват средната ширина на профила на разпределение на размера. Увеличаването на размерите им показва огромна реорганизация на EggPC LUVs/CS NPs дисперсията с голяма вариация в размера на формираните агрегатите. При CS-CuO HNCs обаче се наблюдава подобно разпределение на размера на третираните LUVs, което не зависи от изследваните концентрации (фиг. 8C). Тестваните NMs увеличават стойностите на  $\zeta$ -потенциала на EggPC LUVs (фиг. 8B и D). Дори и най-ниската тествана концентрация (4  $\mu\text{g/ml}$ ) е достатъчна за рязка промяна на знака на потенциала от отрицателен (-19 mV при чистите LUVs) в положителен (+19 mV при декорираните с NMs LUVs). С увеличаване на концентрацията на NMs в дисперсията се установяват слаби промени в абсолютната стойността на  $\zeta$ -потенциала, което показва, че общият повърхностен заряд на декорираните везикули не се повлиява дори и при най-високите концентрации. Забелязва се, че стойностите на потенциала на декорираните с CS-CuO HNCs EggPC LUVs са по-ниски от тези на декорираните с CS NPs (фиг. 8B и D). Този резултат, в комбинация със сходното разпределение на размера, показват, че възникват по-слаби взаимодействия между EggPC LUVs и CS-CuO HNCs в сравнение с CS NPs.

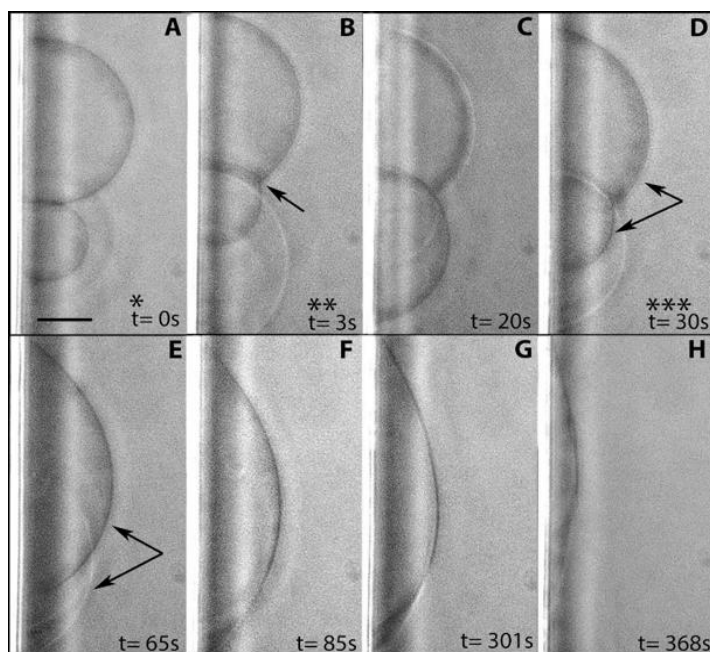


**Фигура 8:** Ефекти на CS NPs (A и B) и CS-CuO HNCs (C и D) върху средния размер, полидисперсност и  $\zeta$ -потенциал на EggPC LUVs. SDs са получени от два експеримента с пет измервания на проба. Статистическа значимост се изразява с: \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ . С ns (not significant) се обозначава статистически незначими разлики.

### IV.2.3. Морфологични промени на GUVs, индуцирани от NMs

#### IV.2.3.1. Ефекти върху хомогенни EggPC GUVs, модел на L<sub>d</sub> фаза

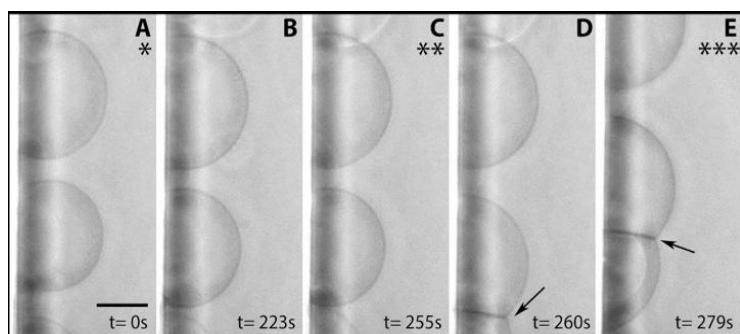
Хомогенни гигантски униламеларни везикули (giant unilamellar vesicles – GUVs), съставени от EggPC, се електроформират в ddH<sub>2</sub>O с pH 5.5 при стайна температура (22°C). Наноматериалите се добавят към работната камера в последователни стъпки (всяка стъпка е отбелязана със звездичка на фигурите). Подобно на експериментите с LUVs, и тук тестваните NMs се добавят асиметрично, съответно взаимодействията им с липозомите са от към външния монослой на мембрания бислой. На фиг. 9 е показан ефектът на чистите CS NPs върху хомогенните GUVs, визуализирани чрез фазов-контраст. През първите 15 минути, при концентрация от 0.02 mg/ml на CS NPs, не са наблюдават промени в обема и морфологията на липозомите (фиг. 9A). След втората стъпка обаче, при 0.04 mg/ml обемна концентрация на CS NPs (фиг. 9B), се наблюдава бърза адхезия между две съседни GUVs, които формират обща адхезионна равнина (черните стрелки). След третата стъпка, при 0.08 mg/ml обемна концентрация на CS NPs, адхезираните GUVs фузират в една по-голяма (фиг. 9D и E). Последната започва да се свива прогресивно до пълно изчезване от повърхността на електрода (фиг. 9F-H). В работната камера не се откриват видими микронни CS-липидни агрегати. Предполага се образуването на наномасщабни CS-липидни агрегати под формата на смесени мицели. Времетова продължителност на пълния колапс на липозомите е  $289 \pm 96$  s и зависи от размерите им. Колкото по-голям е размерът на GUV, толкова по-дълго е времето за колапса. Стандартното отклонение на времето на колапс е изчислено за 12 липозоми от 12 отделни експеримента.



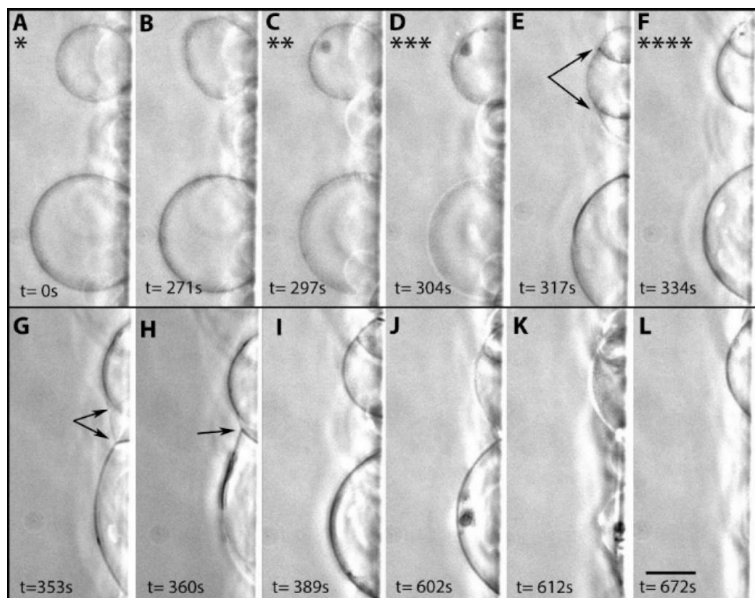
**Фигура 9:** Ефект на CS NPs върху морфологията на EggPC GUVs при стайна температура (22°C). EggPC GUVs се третира с аликвотни концентрации на CS NPs – 0.02, 0.04 и 0.08 mg/ml. А) Първа стъпка, третиране с CS NPs при концентрация 0.02 mg/ml. Не се наблюдават промени в обема и морфологията на везикулите (не е показано на фигурата). В и С) Втора стъпка, третиране с 0.04 mg/ml CS NPs и  $t=0$  s, наблюдава се бърза адхезия на двете съседни липозоми, формиращи плоска контактна площ (следвай черните стрелки). D) Трета стъпка, при концентрация 0.08 mg/ml CS NPs, адхезираните GUVs фузират в една по-голяма везикула. Последната започва да се свива постепенно до изчезване от повърхността на електродите (E-H). Не се наблюдават микронни CS-липид агрегати в работната камера. Мащаб: 20  $\mu$ m.

Тъй като CS NPs са разтворени в 1% (v/v) AA, е проведен и контролен експеримент за оценка на въздействието на AA върху EggPC GUV. Тестваните концентрации на NMs в експериментите са не повече от 0.1 mg/ml, разтворени в 0.1% AA. Следователно, 0.1% AA се тества в същите концентрации, аналогични на експериментите с CS NPs (фиг. 10), за да се получат следните концентрации в работната камера – 0.02 mg/ml (0.02% AA), 0.04 mg/ml (0.04% AA) и 0.08 mg/ml (0.08% AA). След първата стъпка, при 0.04% AA обемна концентрация, не се наблюдават промени във формата на EggPC GUVs (фиг. 10A и B). Пет секунди след втората стъпка, 0.08% AA обемна концентрация, двете GUVs адхезират (фиг. 10C и D, стрелки). Площта на контактната адхезионна равнина става по-голяма след третата стъпка, при обемна концентрация 0.16% AA (фиг. 10E). Процесът на адхезия беше проследен за 8 липозоми, разкривайки средна продължителност от  $3,4 \pm 3,7$  s за появата на адхезия след втората стъпка. В сравнение с CS NP, адхезията, индуцирана от AA, е по-силна. Но въпреки това, адхезираните EggPC GUVs не претърпяват допълнителни морфологични промени.

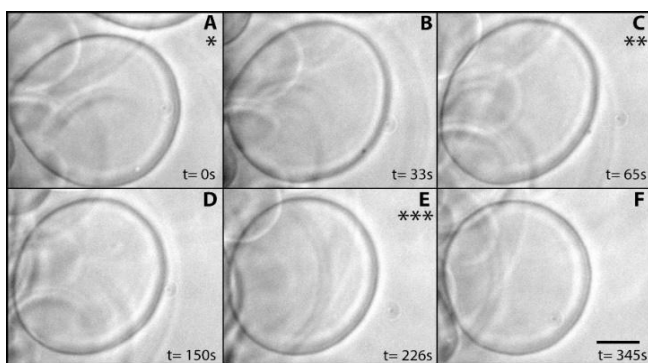
При третиране на EggPC GUVs с CS-ZnO HNCs се наблюдават същите морфологични трансформации като при CS NP, но при два пъти по-високи концентрации (Фиг. 11). Адхезия, сливане и прогресивно свиване на липозомите се наблюдават съответно при 0.08 mg/ml и 0.16 mg/ml (фиг. 11D и F). Нанокompatитът PEG-ZnO индуцира слаби морфологични промени върху EggPC GUV (Фиг. 12) при тестваните концентрации. Отчита се единствено леко редуциране на обема на липозомата при концентрации от 0.04 mg/ml и 0.08 mg/ml (фиг. 12C и E).



**Фигура 10:** Ефекти на 0.1 % AA върху морфологията на EggPC GUVs при стайна температура (22°C). А, В) Първа стъпка, 0.02% AA, не се наблюдават промени в морфологията на GUVs. С и D) Втора стъпка, 0.04% AA, GUVs адхезират и образуват обща адхезионна равнина (черни стрелки). Е) Трета стъпка, 0.08% AA, контактната равнина става по-голяма, адхезията става по-силна. Мащаб: 20  $\mu$ m.



**Фигура 11:** Ефекти на CS-ZnO NMs върху морфологията на EggPC GUVs при стайна температура (22°C). GUVs се третираат с аликвотни концентрации от CS-ZnO NMs: 0.02, 0.04, 0.08 и 0.16 mg/ml. A-C) Първите две стъпки, не се наблюдават морфологични промени. D-E) Трета стъпка, при концентрация от 0.08 mg/ml, възникване на адхезия между трите GUVs с леко редуциране на обема им. F-H) Четвърта стъпка, концентрация от 0.16 mg/ml, наблюдаване на трета адхезия. I-L) През следващите 6 мин, везикулите продължават да се свиват до изчезване от повърхността на електрода. Мащаб: 20  $\mu\text{m}$ .



**Фигура 12:** Ефекти на PEG-ZnO NMs върху морфологията на EggPC GUVs при стайна температура (22°C). GUVs се третираат с аликвотни концентрации на PEG-ZnO NMs: 0.02, 0.04, 0.08 mg/ml. A-B) Първа стъпка, третиране с концентрация от 0.02 mg/ml PEG-ZnO. Наблюдават се леки флукутации във формата на липозомите C-D) Втора стъпка, 0.04 mg/ml PEG-ZnO, леко свиване и закръгляне на липозомата. E-F) Трета стъпка, 0.08 mg/ml PEG-ZnO, обемът на липозомата намалява слабо. Мащаб: 20  $\mu\text{m}$ .

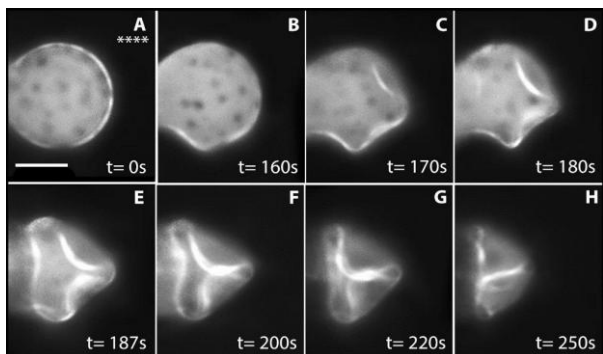
При третиране на EggPC GUVs с CS-ZnO HNCs се наблюдават същите морфологични трансформации като при CS NP, но при два пъти по-високи концентрации (Фиг. 11). Адхезия, сливане и прогресивно свиване на липозомите се наблюдават съответно при 0.08 mg/ml и 0.16 mg/ml (фиг. 11D и F). Нанокomпозитът PEG-ZnO индуцира слаби морфологични промени върху EggPC GUV (Фиг. 12) при тестваните концентрации. Отчита се единствено леко редуциране на обема на липозомата при концентрации от 0.04 mg/ml и 0.08 mg/ml (фиг. 12C и E).

#### IV.2.3.2. Ефекти върху хетерогенни EggPC/EggSM/Chol GUVs, модел на $L_d/L_o$ фазово съвместно съществуване

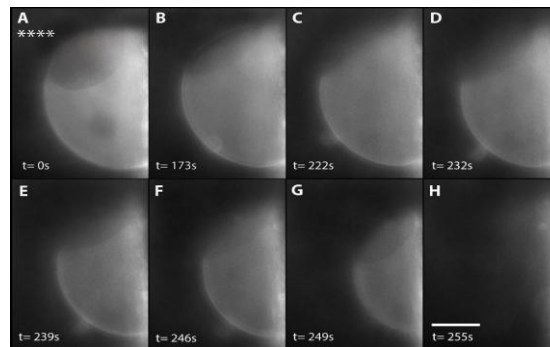
Еукариотните клетъчни мембрани са хетерогенни по отношение на фазовото си състояние, което има много важна структурна и функционална значимост за мембраните. За визуализиране на взаимодействието на тестваните NMs с такива хетерогенни мембрани, се използват GUVs, съставени от EggPC/EggSM/Chol (2/2/1). Тези модели показват  $L_o/L_d$  ко-съществуване при стайна температура. Фазовото разделяне в GUVs се наблюдава чрез флуоресцентна микроскопия. За тази цел се използва ненаситен Rhodamine-PE, който се разпределя в  $L_d$  фазата. Съответно, тя е светлата, флуоресциращата част от везикулата, а  $L_o$

фазата се организира в тъмни микро-домени, наподобяващи рафт-подобните домени в клетъчните мембрани (фиг. 13А, 14А). Хетерогенните GUVs се третират с концентрации на CS NPs - 0.02, 0.04, 0.08 и 0.16 mg/ml. При взаимодействие на CS NPs с тези модели се наблюдават два вида морфологични трансформации – мембранни инвагинации (фиг. 13) и свиване на липозомата през  $L_d$  фазата (фиг. 14). След първите три стъпки, обхващащи общи обемни концентрации от 0.02 до 0.08 mg/ml на CS NPs, не се забелязват промени в обема и морфологията на везикулата (фиг. 13А). След третиране с най-високата концентрация от 0.16 mg/ml, за 2.6 min GUV претърпя инвагинации на три различни места, придружени от постепенно свиване (фиг. 13А-Н). Не се установява връзка между хетерогенната мембранна структура и настъпилите инвагинациите. Средната скорост на намаляване на площта на GUV е приблизително  $30 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Вторият вид морфологични трансформации върху хетерогенните GUVs, индуцирани от CS NPs, е свиване през светлата  $L_d$  фаза (фиг. 14). Тази везикула притежава един голям и един по-малък  $L_o$  домен при стайна температура. Разликата в размерите на  $L_o$  домовете между двете представени GUVs (фиг. 13А и 14А) е вследствие на разликата в размерите им и мембранното напрежение. Колкото по-голяма е везикулата, толкова по-големи са и  $L_o$  домовете. Представената на фиг. 14 хетерогенна GUV е третирана със същите концентрации на CS NPs и подобно на предходния експеримент, морфологичен ефект се наблюдава при най-високата тествана концентрация. За 2.8 min при концентрация от 0.16 mg/ml, GUV започва прогресивно да се свива през  $L_d$  фазата до пълно изчезване от повърхността на електрода (фиг. 14В-Н). Средната скорост на редуциране на площта на липозомата е приблизително  $39 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Подобно при хомогенните GUVs, и тук не се наблюдават видими CS-липид микронни агрегати в работната камера. Въз основа на това се установява, че CS NP взаимодействат с моделните мембрани чрез дезинтеграция на липидния бислой. В резултат на това се образуват CS-липидни агрегати, по-малки от няколко микрометра, което е границата на разделителната способност при оптичната микроскопия. Не се наблюдават и микронни пори в GUVs мембраната при взаимодействие с CS NPs.

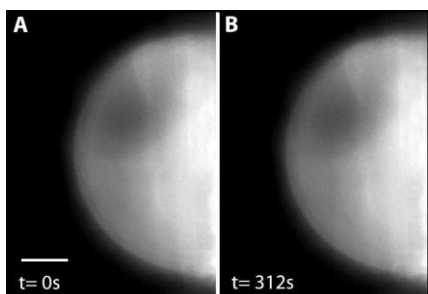
Върху  $L_o/L_d$  GUVs са проведени контролни експерименти с 0.1% (v/v) AA в концентрации, еквивалентни на експериментите на фиг. 13 и 14. Установява се, че AA не индуцира морфологични промени в липозомата независимо от тестваните концентрации (фиг. 15). Следователно, активността и морфологичните ефекти на CS NPs върху хетерогенните везикули не се повлияват от използваната AA за разтварянето на наноматериалите.



**Фигура 13:** Мембранни инвагинации при хетерогенни GUVs, индуцирани от CS NPs. EggPC/EggSM/Chol (2/2/1) GUVs показва  $L_d/L_o$  фазово съвместно съществуване при стайна температура (22°C). Везикулата е белязана с 1 mol % Rhodamine-PE. GUVs се третират с аликвотни концентрации на CS NPs: 0.02, 0.04, 0.08 and 0.16 mg/ml. А) Флуоресцентна снимка, визуализираща фазовото разделяне в GUV – тъмни  $L_o$  домени, заобиколени от флуоресцираща  $L_d$  фаза (бели области). При концентрации на CS NPs от 0.02 до 0.08 mg/ml не се наблюдават морфологични промени (данните не са показани). В-Н) При най-високата концентрация от 0.16 mg/ml започват да се наблюдават вътрешни инвагинации на три различни места в мембраната на GUVs, съпроводени с постепенно свиване. Трансформациите включват и двете фаза в мембраната. Мащаб: 20  $\mu\text{m}$ .



**Фигура 14:** Свиване на GUV през  $L_d$ , индуцирано от CS NPs. EggPC/EggSM/Chol (2/2/1) GUVs показва  $L_d/L_o$  фазово съвместно съществуване при стайна температура (22°C). Везикулата е белязана с 1 mol % Rhodamine PE. GUVs се третират с аликвотни концентрации на CS NPs: 0.02, 0.04, 0.08 and 0.16 mg/ml. А) Флуоресцентна снимка, визуализираща фазовото разделяне в GUV – тъмни  $L_o$  домени, заобиколени от флуоресцираща  $L_d$  фаза (бели области). От 0.02 до 0.08 mg/ml не се наблюдават морфологични промени (данните не са показани). В-Н) При концентрация 0.16 mg/ml CS NPs се наблюдава прогресивно свиване на GUV през  $L_d$  фазата до изчезването и от повърхността на електрода. Мащаб: 20  $\mu\text{m}$



**Фигура 15:** Ефект на 0.1% AA върху морфологията на GUVs, съставени от 2/2/1 EggPC/EggSM/Chol, показващи  $L_d/L_o$  фазово ко-съществуване при стайна температура (22°C). Тествани са три обемни концентрации, съответстващи на тези, използвани в експеримента на фиг. 48 и 49: 0.02, 0.04, 0.08 and 0.16 mg/ml. Не се наблюдават морфологични промени в изследваната времева скала (до 5 min след третиране). Мащаб: 20  $\mu\text{m}$ .

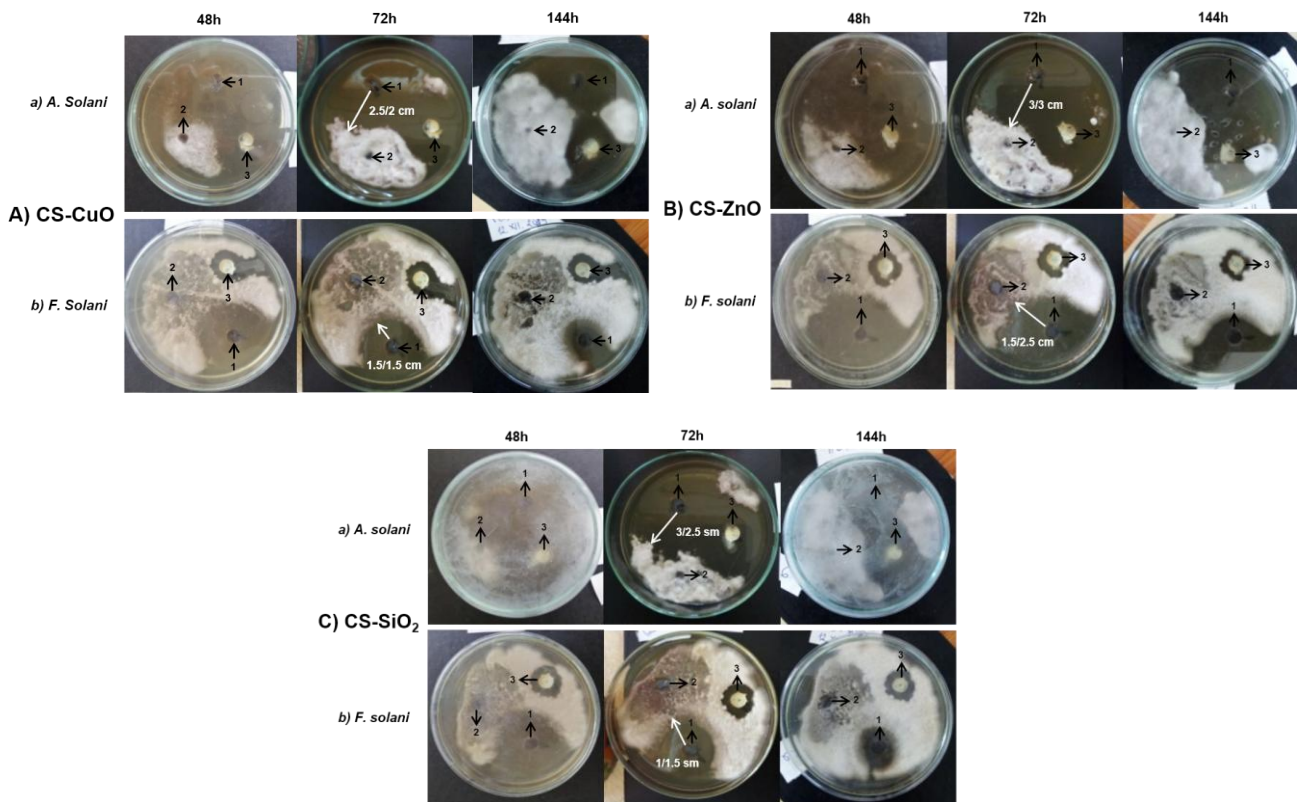
### IV.3. Биоактивност на CS-базираните HNCs срещу фитопатогенни гъби

#### IV.3.1. Антифунгална активност на CS-базираните HNCs

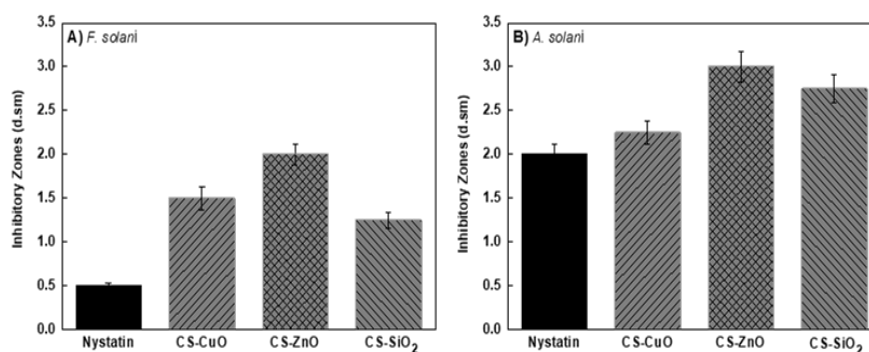
Оценката на антифунгалната активност на CS-базираните HNCs се извършва чрез агар дифузионния метод. За тази цел HNCs се тестват върху фунгална спорова суспензия в следните концентрации - 50, 100 и 200  $\mu\text{g}$ /ямка. За отрицателна контрола се използва 0.2% DMSO, а за положителна – 0.1% нистатин, който е широко използван антифунгален препарат (фиг. 16). Степента на антифунгалната активност се оценява въз основа на размера на инхибиторните зони, образувани около ямките, в които не се наблюдава растеж на фунгалната култура.

Антифунгална активност бе установена при най-високата тествана концентрация от 200  $\mu\text{g}/\text{ямка}$  (2 mg/ml). И двата фунгални щама се оказват чувствителни към действието на тестваните HNCs, като инхибирането на мицелния растеж продължава до 72 h след началото на култивиране (фиг. 16).

Въз основа на три независими култивирания на всяка комбинация от вид HNCs и съответния фунгален щам, са изчислени средните инхибиторни зони (фиг. 17). Установява се, че всички тествани HNCs проявяват много по-силен антифунгален ефект от нистатина. Най-голяма инхибиторна активност срещу двата щама се отчита при CS-ZnO HNCs. Също така, съдейки по размерите на средните инхибиторни зони, по-голяма чувствителност към тестваните HNCs показва *A. solani* в сравнение с *F. solani*.



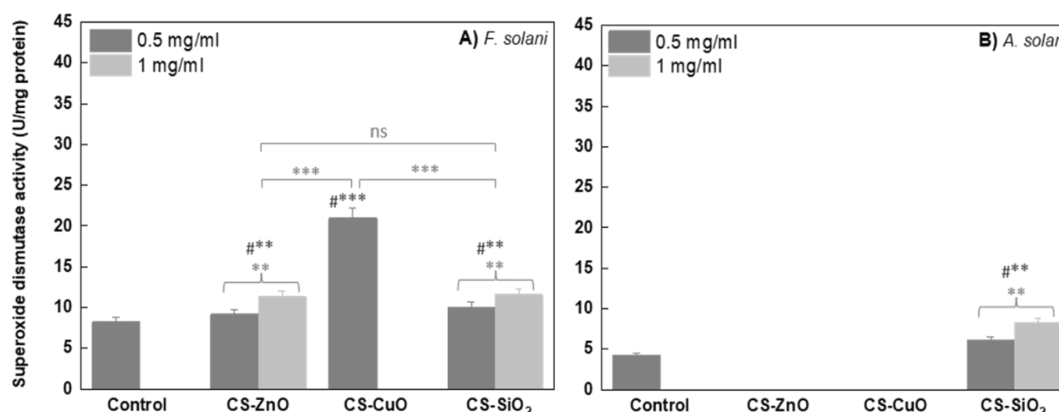
**Фигура 16:** Антифунгална активност на CS-базираните HNCs при концентрация от 200  $\mu\text{g}/\text{ямка}$ , оценена чрез ямкова дифузия на агар при стайна температура (22°C). Ефекти на: А) CS-CuO HNCs, В) CS-ZnO HNCs, С) CS-SiO<sub>2</sub> HNCs върху: а) *A. solani*, б) *F. solani*. Ямките са обозначени като: 1 – HNCs, 2 – 0.2 % DMSO, 3 – 0.1%



**Фигура 17:** Средни инхибиторни зони, индуцирани от CS-базираните HNCs, при концентрация от 200 µl/ямка след инкубация от 72 h при 22°C. Средни инхибиторни зони при А) *F. solani* и В) при *A. solani*. Размерът на средните инхибиторни зони и при двата щама са изчислени въз основа на три повторения на всеки вид третиране (щам с вид HNCs). Разликите между средните инхибиторни зони са статистически значими - \*\* $p < 0.01$

### IV.3.2 Маркери за оксидативен стрес

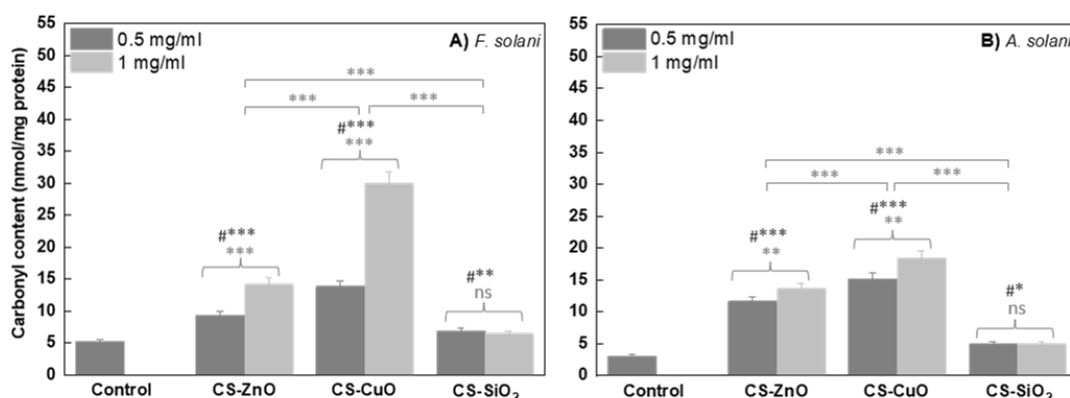
Щамовете се култивират дълбочинно в присъствието на CS-базираните HNCs в две концентрации от 0.5 и 1.0 mg/ml. Отчитат се нивата на карбонилни групи като маркер за оксидативно увредени белтъци, MDA като маркер за липидна пероксидация и активност на SOD като ензим от първата линия на антиоксидантната защита на клетката. При *F. solani* се установява повишена SOD активност в резултат на действието на всички тествани CS-базирани HNCs (фиг. 18A). Най-висока ативност се установяват при третиране с 0.5 mg/ml CS-CuO HNCs (21 U/mg protein), надвишаващи 2.5 пъти тези на контролния вариант. Третирането с CS-SiO<sub>2</sub> и CS-ZnO HNCs води до дозозависимо увеличение на SOD. При *A. solani* ефект се забелязва единствено при третиране с CS-SiO<sub>2</sub> HNCs, но в сравнение с *F. solani* (10 и 12 U/mg protein) SOD активността е по-ниска и при двете тествани концентрации (6 и 8 U/mg protein) (фиг. 18B).



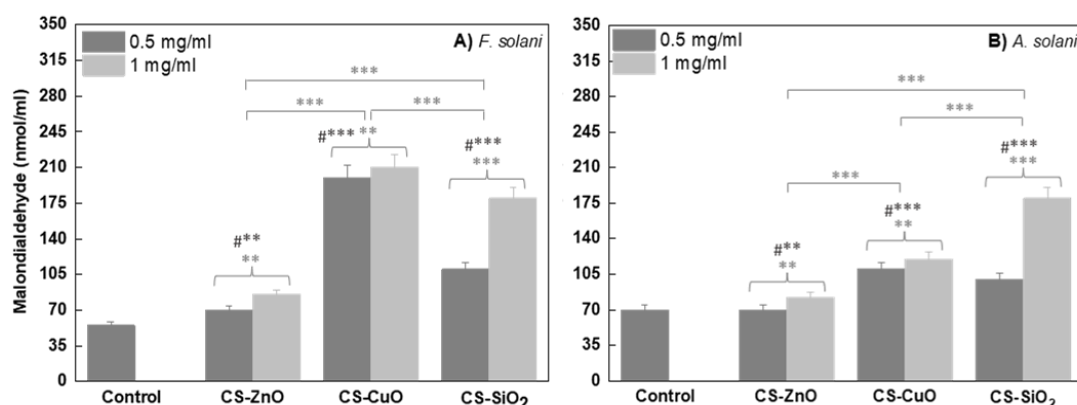
**Фигура 18:** Нива на SOD активност в U/mg protein, в зависимост от вида на HNCs в две концентрации от 0.5 и 1 mg/ml. SOD активност при: А) *F. solani* – контрола 8.26 U/mg protein; В) *A. solani* – контрола 4.25 U/mg protein. SDs са получени от три отделни експеримента с по четири повторения на проба. Статистическата значимост между ефектите на HNCs е изразена с: \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$  и \*  $p < 0.001$ . Статистическа значимост между ефектите на HNCs и контролата е изразена с: \*\*\*  $p < 0.01$ , и \*\*  $p < 0.05$ . С “ns” (not significant) се обозначава статистически незначими разлики.

Всички тествани CS-базирани HNCs увеличават нивата на PCC във фунгалните клетки спрямо контролните варианти. При CS-CuO и CS-ZnO HNCs се наблюдава дозозависим ефект (фиг. 18).

Най-високи нива на PCC и при двата щама се установяват при третиране с 1 mg/ml CS-CuO HNCs. Клетките на *F. solani* демонстрират по-висока чувствителност към 1 mg/ml CS-CuO HNCs (30 nmol/mg protein) (фиг. 19A) в сравнение с тези на *A. solani* (18.45 nmol/mg protein) (фиг. 19B). Най-ниски нива на PCC се установяват при третиране с SiO<sub>2</sub> HNCs. Ефектът им е еднакъв при двете тествани концентрации и е сравним в двата фунгални щама.



**Фигура 19:** Нива на PCC в nmol/mg protein в зависимост от вида на HNCs в две от 0.5 mg/ml и 1 mg/ml. PCC нива при: А) *F. solani* – контрола 5.2 nmol/mg protein; В) *A. solani* – контрола 3.089 nmol/mg protein. SDs са получени от три отделни експеримента с по четири повторения на проба. Статистическата значимост между ефектите на HNCs е изразена с: \*\*\*  $p < 0.001$  и \*\*  $p < 0.01$ . Статистическа значимост между ефектите на HNCs и контролата е изразена с: \*\*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.01$ , и #\*  $p < 0.05$  и ns (при сравнение на 0.5 и 1 mg/ml SiO<sub>2</sub> HNCs).

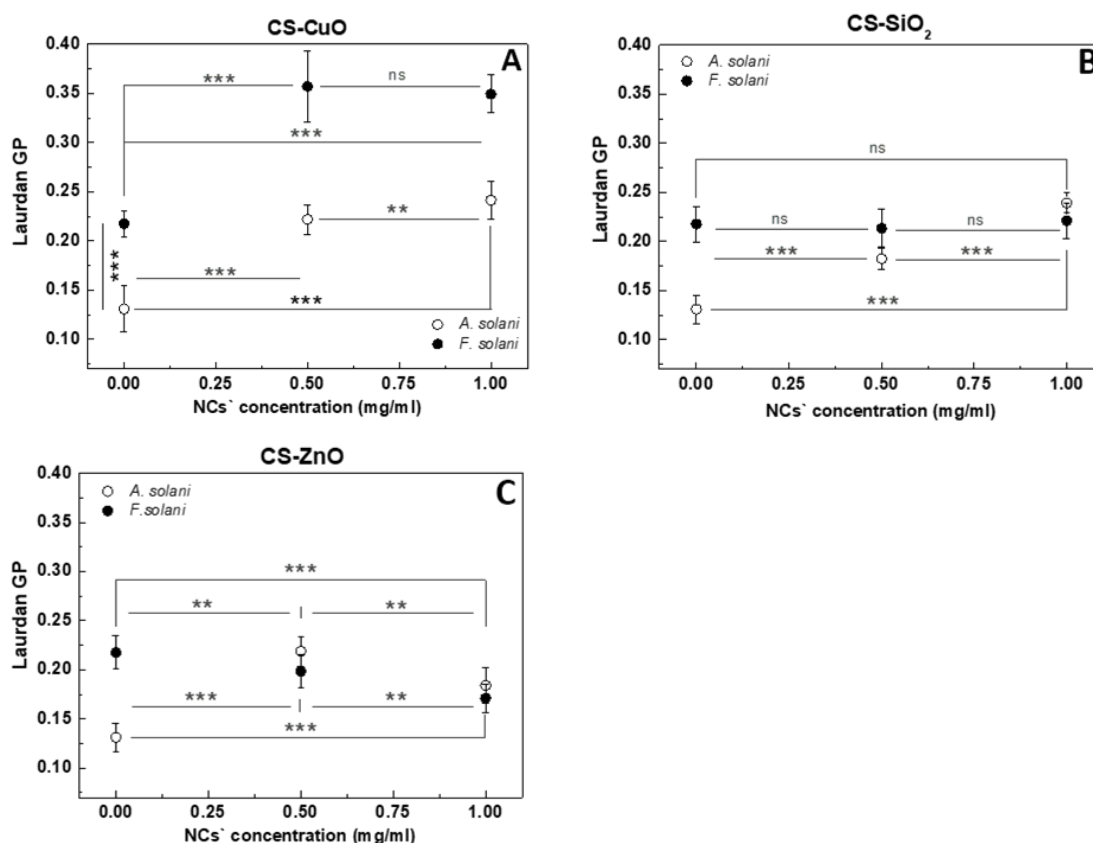


**Фигура 57:** Нива на MDA в nmol/ml в зависимост от вида на HNCs в две концентрации от 0.5 mg/ml и 1 mg/ml. MDA нива при: А) *F. solani* – контрола 55 nmol/ml; В) *A. solani* – контрола 70 mol/ml. SDs са получени от три отделни експеримента с по четири повторения на проба. Статистическата значимост между ефектите на HNCs е изразена с: \*\*\*  $p < 0.001$  и \*\*  $p < 0.01$ . Статистическа значимост между ефектите на HNCs и контролата е изразена с: \*\*\*\*  $p < 0.001$  и \*\*\*  $p < 0.01$ .

### IV.3.3. Промени в липидната подреденост на фунгалните мембрани

Количествените промени в молекулната подреденост на фунгалните мембрани, индуцирани от CS-базираните HNCs, се измерват чрез Лаурдан флуоресцентна спектроскопия. И двата фунгални щама се третират с две концентрации на HNCs - 0.5 и 1 mg/ml. Фунгалната суспензия и добавените към нея HNCs се инкубират за 10 min преди измерване.

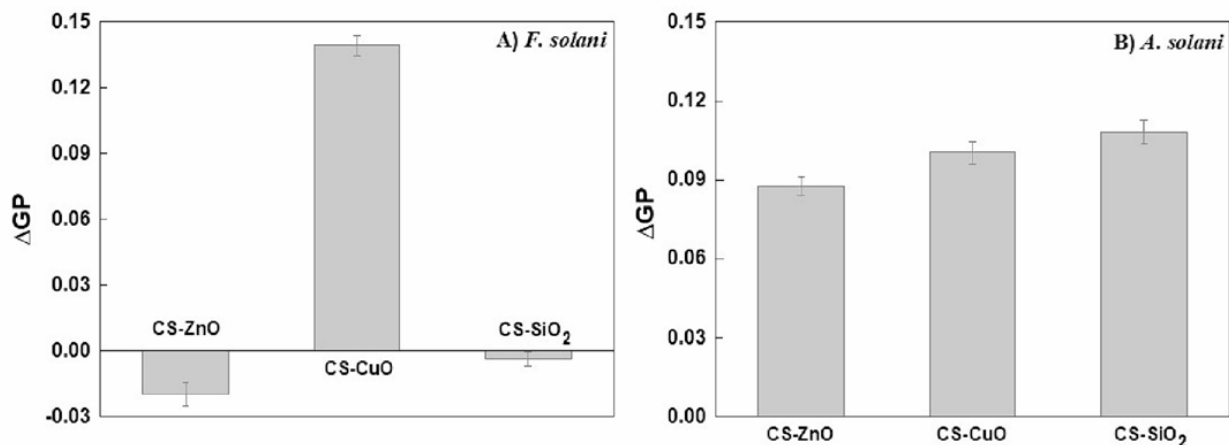
Повишените GP стойности при двата щама след третиране с CS-CuO HNCs са показателни за увеличаване на липидна подреденост в мембраните (фиг. 21A). При ниската концентрация (0.5 mg/ml) се забелязва рязко увеличаване на GP стойностите. При високата концентрация (1 mg/ml) не се установява значима промяна в подредеността на мембраните. Подреждащият ефект на CS-CuO HNCs е по-силно изразен върху мембраните на *F. solani*, отразен в по-високите GP стойности. Хибридният нанокompatит от CS-SiO<sub>2</sub> индуцира концентрационно-зависимо увеличаване в мембранната подреденост единствено при *A. Solani*, докато при *F. solani* тези HNCs не показват значим ефект и при двете тествани концентрации (фиг. 21B).



**Фигура 21:** Лаурдан GP стойности на молекулната подреденост в мембраните на *A. solani* и *F. solani* като функция от концентрацията на CS-базираните HNCs, измерени при стайна температура (22 °C). Ефект на: А) CS-CuO; В) CS-SiO<sub>2</sub>; С) CS-ZnO HNCs. SDs на GP стойностите са получени от три отделни експеримента с по четири повторения на проба. Статистическа значимост между GP стойностите е изразена с: \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*  $p < 0.05$ . С "ns" (not significant) се обозначава статистически незначими разлики.

Щамово-зависим ефект се установява при CS-ZnO HNCs (фиг. 21). При *A. solani* третиране с CS-ZnO HNCs предизвиква увеличаване на мембранната подреденост, като този ефект е най-силно изразен при ниската концентрация от 0.5 mg/ml. При *F. solani* обаче CS-ZnO HNCs предизвиква концентрационно-зависимо понижаване на GP стойностите, индикатор за намаляване на мембранната подреденост - флуидизиращ ефект.

На фиг. 22 са представени количествените промени в подредеността на фунгалните мембрани в зависимост от вида на тестваните HNCs. С  $\Delta GP$  се изразява разликата между GP стойностите при 0.5 mg/ml и контролните GP стойности. Сред тестваните CS-базирани HNCs CS-CuO индуцират най-значимите количествени промени ( $\Delta GP = 0.1392$ ) в мембранната подреденост на *F. solani*. Хибридните нанокompозити CS-ZnO ( $\Delta GP = -0.0196$ ) и CS-SiO<sub>2</sub> HNCs ( $\Delta GP = -0.0034$ ) (фиг. 59A), обаче, оказват противоположен ефект с изразено намаляване на подредеността, показателно за флуидизиращ ефект. При *A. solani* всички тествани CS-базирани HNCs предизвикват големи количествени промени със силно изразен подреждащ ефект върху мембраната на тази гъба (Фиг. 59B). Количествените промени в *A. solani*, индуцирани от HNCs са в следния низходящ ранг: CS-SiO<sub>2</sub> ( $\Delta GP = 0.1081$ ) > CS-CuO ( $\Delta GP = 0.1004$ ) > CS-ZnO ( $\Delta GP = 0.0877$ ).



**Фигура 22:** Лаурдан  $\Delta GP$  при двата фунгални щама като функция от вида на CS-базирани HNCs при 22°C.  $\Delta GP = GP (0.5 \text{ mg/ml}) - GP (0 \text{ mg/ml})$ . Количествени промени в мембраните на: А) *F. solani*; В) *A. solani*. Количествените промени в мембранната подреденост между двата щама, индуцирани от всеки един вид CS-базиран HNCs, са статистически значими -  $**p < 0.01$ .

## V. Дискусия

### V.1. Взаимодействия между CS-базирани и PEG-базирани HNCs с мембранни модели, имитиращи фазовата хетерогенност на еукариотните клетъчни мембрани

С помощта на опростени мембранни системи без протеинов компонент и с ясно дефинирана липидна фаза бяха утановени ключови принципи на взаимодействия и взаимовръзки между наблюдаваните ефекти и физикохимичните характеристики на тестваните NMs. CS-базирани и PEG-базирани HNCs притежават комбинации от характеристики, покриващи критерии за добра биоактивност. Според получените HRTEM изображения всички NMs показват сферична форма (фиг. 1), която се приема за биологично съвместима и предполага по-добра интернализация в клетките [4]. Според получените DLS профили средните размери на NMs са в диапазона от 38 nm до 1.1  $\mu\text{m}$ , а  $\zeta$  - потенциалите им варират от +34 до +10 mV (табл. 1). Независимо от тези различия, всички изследвани NMs демонстрират биоактивност, взаимодействат с мембранните модели и индуцират структурни и морфологични промени в бислоя на различни липидни фази.

#### V.1.1. Ефекти на NMs върху липидната подреденост на хомогенни и хетерогенни фази

Настъпилите промени в липидната подреденост на различни мембранни фази при взаимодействия с NMs бяха оценени чрез изчисляване на общата поляризация (GP), която отразява промените в полярността (хидратацията) на нивото на глицероловия скелет на липидите. Резултатите сочат, че всички тествани NMs взаимодействат с различни мембранни липиди в различни фази и променят липидната им организация. Най-голям ефект бе установен от CS NPs върху високо флуидната  $L_d$  фаза, съставена от EggPC. Чистите CS NPs по концентрационно-зависим начин намаляват полярността около глицероловия скелет на липидите и увеличават подредеността в тази част на мембрания бислой. Този резултат е в съответствие с изследване, установяващо, че подреждащия ефект на CS NMs нараства с увеличаване на съдържанието на полиненаситени мастни киселини в моделни мембрани, каквито преобладават в една  $L_d$  фаза [5]. Поради катионния си заряд, CS NPs (+34 mV) се привличат електростатично от отрицателно заредените EggPC мембрани (-19 mV). CS NPs след адхезиране по повърхността на мембраната могат да образуват водородни връзки с холиновата полярна глава на EggPC [6, 7]. Водородните връзки се формират между свободните amino групи на CS (донор) и фосфатните остатъци на EggPC (акцептор). В резултат на това, достъпът на водните диполи около глицеролния скелет се възпрепятства. Поради намаления им брой и мобилност, диполната релаксация на лаурдана се забавя, отразявайки по-високи GP стойности. От друга страна, присъствието на CS NPs в областта на глицерола може да увеличи вискозитета на микросредата, обкръжаваща полярните глави на липидите, което също допринася за забавената диполна релаксация на флуорофора. В допълнение към електростатичните сили и водородните

връзки, CS може да взаимодейства с мембраната посредством хидрофобни взаимодействия [7, 6]. Малките размери на CS NPs (40 nm) позволяват навлизане в самия бислой до определена дълбочина и взаимодействие с хидрофобното ядро на бислоя [6]. По този начин CS NPs могат физически да изместват водни молекули около липидите, намалявайки полярността на мембраната на това ниво и увеличавайки липидната подреденост в тази дълбочина на бислоя.

CS-базираните HNCs с ZnO, CuO и SiO<sub>2</sub> HNCs предизвикват по-малки количествени промени в липидната подреденост на L<sub>d</sub> фазата. Поради по-ниските стойности на  $\zeta$  - потенциалите им, между CS-базираните HNMs и мембраната възникват два пъти по-слаби електростатични взаимодействия в сравнение с CS NPs. По-големите им размери от своя страна допринасят за значително понижаване на съотношението повърхност-към-обем, намалявайки броя взаимодействия с мембраната [8]. В резултата на това тези HNCs не могат да проникват дълбоко в мембранныя бислой и взаимодействията се поддържат предимно на ниво мембранна повърхност, поне при тестваните концентрации. Хибридният нанокompозит от PEG-ZnO предизвиква най-малки количествени промени в L<sub>d</sub> фазата. Според DLS профила си този HNCs е с най-големи размери (1.1  $\mu\text{m}$ ) и най-ниски стойности на  $\zeta$  – потенциала (+10 mV), които се приемат за почти електронеутрални [9]. Тази комбинация от размер и електронеутралност възпрепятства по-ефективни взаимодействия с мембраните. Въпреки това, слабият подреждащ ефект може да бъде преписан на добрата хидрофилност на PEG, чрез която може така ефективно да дехидратира PC мембраните и да намалява полярността на бислоя [10].

В мембранны системи, съдържащи Chol, количествените промени, индуцирани от NMs, бяха значително по-ниски в сравнение с L<sub>d</sub> фазата. Като модели на подредена L<sub>o</sub> фаза бяха използвани два вида бинарни смеси - EggPC/Chol и EggSM/Chol (1/1). От резултатите се установи, че подреждащия ефект върху EggPC/Chol L<sub>o</sub> фазата е три пъти по-голям в сравнение с рафт-подобната EggSM/Cho L<sub>o</sub> фаза. Присъствието на Chol промотира по-слаба адхезия на NMs по повърхността на мембраната [11]. От една страна, Chol може да намали концентрационно повърхностния заряд на мембраната [12], водещо до по-слаби взаимодействия с катионните NMs. От друга страна, Chol кондензира бислоя, генерирайки L<sub>o</sub> мембрани с първоначално висока липидна подреденост, върху която NMs не могат да въздействат с допълнително подреждане на липидите. Следователно, колкото по-неподреден и полярен първоначално е липидният бислой, толкова по-силно проявен ще бъде подреждащия ефект на изследваните CS-базирани NMs.

Трикомпонентната смес от EggPC/EggSM/Chol (2/2/1) показва фазово L<sub>d</sub>/L<sub>o</sub> ко-съществуване при физиологична температура от 37°C. Поради тази причина тази смес е избрана за най-подходящия модел за фазовата хетерогенност на еукариотната клетъчна мембрана. Количествените промени в липидната подреденост на тези хетерогенни системи бяха по-големи за L<sub>d</sub> и по-малки за L<sub>o</sub> фазата като най-силен ефект бе установен за CS NPs. Предвид тези резултати, може да се предположи, че катионните CS NPs взаимодействат преференциално с

флуидната  $L_d$  фаза от хетерогенните мембрани. Тази фаза е по-полярна, с ниско съдържание на Chol и поради тази причина повърхностният заряд е по-електроотрицателен.  $L_o$  фазите са по-пакетирани, с по-ниска полярност и намален отрицателен повърхностен заряд заради високото съдържание на Chol, поради което възникват по-слаби взаимодействия с NMs.

### **V.1.2. Промени в колоидните характеристики на мембранни модели**

Промените в колоидните характеристики на EggPC LUVs при взаимодействие с CS NPs и CS-CuO NMs бяха оценени чрез DLS и ELS. Стойността на  $\zeta$  - потенциала на нетренираните EggPC LUVs е  $-19$  mV (фиг. 45), което представлява електроотрицателен повърхностен заряд. Полярната глава на EggPC е цвистерйонна и нейната протонация/депротонация зависи пряко от pH на средата. При  $pH > 4$  холиновата глава става отрицателно заредена [13] поради депротонацията на фосфатния остатък и привличането на противойони от кватернерния амин. EggPC LUVs са диспергирани в ddH<sub>2</sub>O с pH 5.5, което допринася за отрицателния  $\zeta$  – потенциал на везикулите в тази среда. Дисперсиите с CS NPs също са приготвени в ddH<sub>2</sub>O с pH 5.5 и  $\zeta$  - потенциалът на CS NPs в тази среда е  $+33.5$  mV, дължащо се на протонацията на свободните amino групи. CS е положително зареден в кисели разтвори с  $pH < 6.3$  [3].

Разликите между  $\zeta$  - потенциалите на катионните NMs и електроотрицателните EggPC LUVs е предпоставка за възникване на електростатични сили на привличане, водещи до адхезия на NMs по повърхността на мембраните. Това е отразено в рязкото изместване на  $\zeta$  -потенциала от отрицателен ( $-19$  mV) към положителен ( $+19$  mV). С увеличаване на концентрацията на CS NPs потенциалът на декорираните везикули нараства, показателно за адхезията на CS NPs по повърхността на мембраната. Тази декорация постепенно намалява електростатичните сили на отблъскване между везикулите и индуцира тяхното агрегиране в дисперсионната среда. DLS профилът на CS NPs/EggPC LUVs дисперсията показва, че средният размер на получените агрегати (312 nm) е три пъти по-голям спрямо контролата (110 nm) и със значително увеличена полидисперсност (200 до 400 nm), демонстриращо хетерогенна популация от агрегати в дисперсията. Сходни резултати са наблюдавани и при наситен фосфатидилхолинов модел, при който е демонстрирано, че CS NPs увеличават  $\zeta$  - потенциала, средния размер и полидисперсност на DPPC (dipalmitoyl phosphatidylcholine – дипалмитоилфосфатидилхолин) везикули [6]. CS-CuO HNCs притежават сравнително по-нисък  $\zeta$ -потенциал ( $+16$  mV) в сравнение с CS NPs, дължащо се на взаимодействията между металните оксиди и полимера по време на синтеза. Тези взаимодействия водят до агломерация и формирането на по-големи HNCs (438 nm). Въпреки това, по повърхността на HNCs остават достатъчно експонирани amino групи, които запазват катионния им заряд при pH 5.5 (ddH<sub>2</sub>O). Въпреки значително по-големия им размер, CS-CuO HNCs индуцират сходни промени в  $\zeta$ -потенциала на везикулите, но не предизвикват промяна в техните средни размери и полидисперсност. Това предполага, че колоидните взаимодействия с

моделите протичат по различен механизъм в резултат на по-малкия заряд и по-големите размери на HNCs.

DLS изследвания от други автори показват, че колоидните взаимодействия между твърди NMs и фосфатидилхолинови мембранни модели се влияят от концентрациите и размерите на частиците [14, 15]. С увеличаване на концентрацията или на средните размери на NPs се наблюдава изместване на пика на разпределение в DLS профила на NPs/LUVs дисперсията към този на чистите NPs. При ниски концентрации на NPs, когато съотношението на липидите е по-високо от това на NPs в дисперсията, в DLS профилът се появява или един пик, който е близък до този на чистите LUVs, или два пика – един, за взаимодействащата популация (NPs/LUVs) и един за невзаимодействащи LUVs [15]. Това явление се наблюдава в междинната зона между профилите на разпределение на чистите LUVs и тези на чистите NPs. При високи концентрации на NPs цялата популация от LUVs може да взаимодейства с NPs, което води до появата на един пик в DLS профила на дисперсията, съвпадащ с този на чистите NPs. Същите колоидни взаимодействия се наблюдават и при увеличаване на размера на NPs. Малките NPs (5–10 nm) формират дисперсия с DLS профил, съвпадащ с този на чистите LUVs, средно големите NPs (25–35 nm) показват разпределение с два пика, разположени между тези на чистите LUVs и чистите NPs, докато големите NPs (50–60 nm) формират профил на разпределение, който съвпада с този на чистите NPs [14]. Тези наблюдения показват, че при третиране на LUVs модели с твърди NPs, които представляват донор на материя, DLS профилът на третираните модели се изместват към DLS профила на чистите NPs.

DLS профилът на CS NPs/EggPC LUVs при най-ниската концентрация на CS NPs (4  $\mu\text{g/ml}$ ) беше идентичен с този на чистите LUVs (пик на разпределение при 110 nm) и бе значително отдалечен от пика на разпределение на CS NPs, центриран при 38 nm. При увеличаване на концентрацията на CS NPs се наблюдаваше един пик на разпределение, изместен към по-големите размери с увеличена средна ширина на разпределението. Това показва формирането на агрегати и увеличаване на полидисперсността на CS NPs/EggPC LUVs дисперсията. При CS-CuO HNCs обаче, независимо от концентрацията, DLS профилът на CS-CuO HNCs/EggPC LUVs показва разпределение на размера, съвпадащ с този на чистите LUVs, без никакво изместване. В DLS профилите на двата типа изследвани дисперсии (CS NPs/EggPC LUVs и CS-CuO HNCs/EggPC LUVs) не се наблюдаваха нови пикове, които да отговарят на разпределението на чистите NPs. Това показва, че всички добавени NMs взаимодействат с везикулите. Въпреки значителните разлики в размерите и потенциалите им, и двата типа NMs декорират везикулите и между тях възникват процеси на обмен на материя. Очевидно е, че по-големите размери и по-ниските стойности на  $\zeta$ -потенциала на CS-CuO HNCs водят до различно колоидно поведение, вероятно в резултат на по-слаби и по-малко на брой взаимодействия с мембраните. Това твърдение е подкрепено и от друго изследване, показващо, че колкото по-

малки са частиците, толкова по-голяма е вероятността за кооперативна адсорбция по повърхността на мембраната и проникване в бислоя. С увеличаване на размера на частиците, обаче, се наблюдава намаляване на взаимодействията и появата на няколко отделни адсорбционни събития върху мембраната [14].

### **V.1.3. Морфологични промени в хомогенни и хетерогенни мембрани**

Ефектът на NMs върху морфологията на мембраните беше оценен с помощта на GUVs, намиращи се в  $L_d$  фаза и в  $L_d/L_o$  фазово ко-съществуване. От получените резултати беше установено, че тестваните NMs взаимодействат с мембраната по начин, по който се индуцират морфологични промени. В предходни трудове, изследващи ефектите на катионните NMs върху морфологията на GUVs, съставени от различни съотношения на цвитерйонни и анионни липиди, беше показано, че NMs могат да индуцират серия от специфични морфологични трансформации, като адхезия, фузия, свиване, образуване на пори и тубули, както и мембранна пермеабилзация [16]. Електростатичните сили на привличане играят решаваща роля за определяне на силата на свързване между катионните NMs и отрицателно заредените GUVs [16]. Когато енергията на свързване е ниска, вследствие на слаби електростатични взаимодействия, катионните NMs индуцират само адхезия между везикулите. Обратно, когато електростатичните сили са силни, енергията на свързване между NMs и GUVs е висока, което води до сливане и свиване на везикулите до тяхното пълно дезинтегриране [16].

В настоящото изследване са наблюдавани сходни морфологични трансформации на GUVs, индуцирани от катионните NMs. Чрез увеличаване на обемната концентрация на NMs в работната камера се модулира общото електростатично привличане и силата на свързване между NMs и GUVs. Върху EggPC GUVs най-силен ефект се установи от CS NPs, поради най-високия си положителен заряд и най-малки размери. При най-ниската концентрация от 40  $\mu\text{g/ml}$  NPs индуцират адхезия между двете съседни GUVs. Нарушаване на интегритета на мембраната и повишаване на пермеабилитета се наблюдава при най-високата обемна концентрация на CS NPs (80  $\mu\text{g/ml}$ ). CS-ZnO HNCs предизвикват същата последователност от морфологични промени, но при два пъти по-високи концентрации – фузия (80  $\mu\text{g/ml}$ ) и свиване (160  $\mu\text{g/ml}$ ). Двойно по-високия концентрационен праг при тези HNCs се дължи на по-ниския им  $\zeta$ -потенциал и по-големите им размери, които определят по-слаби взаимодействия с GUVs. PEG-ZnO HNCs показват най-слаб ефект поради електронеутралността си и най-големите си средни размери сред всички тествани NMs.

Установява се ясна корелация между резултатите върху GUVs и тези получени от лаурдан флуоресцентната спектроскопия. Както бе цитирано по-горе, ефектите на NMs върху липидната подреденост на EggPC LUVs се подреждат в следния низходящ ранг: CS NPs > CS-ZnO  $\approx$  CS-CuO NCs > PEG-ZnO NCs. Следователно се установява, че колкото по-големи са

количествените промени в липидната подреденост на мембраната, толкова по-ниска концентрация от NMs ще бъде необходима, за да се индуцират морфологични промени като адхезия, сливане и свиване на везикулите. В сравнение с CS-ZnO HNCs и PEG-ZnO HNCs, CS NPs индуцират най-големи промени в липидната подреденост и същевременно имат най-нисък концентрационен праг от 40  $\mu\text{g/ml}$  за индуциране на промени в морфологията. Катионните CS NPs привличат силно отрицателно заредената повърхност на EggPC GUVs. Те адхезират по повърхността на мембраната, разпространявайки се по външната повърхност, докато не се установи пълно покритие на везикулната повърхност и се достигне така нареченото стационарно състояние. Постепенната декорация на мембраната с CS NPs намалява електростатичните сили на отблъскване между съседните GUVs, водещо до последващата им адхезия. Над концентрационния праг от 80  $\mu\text{g/ml}$  адхезията изчезва, везикулите се сливат в една по-голяма, която постепенно намалява обема си до пълното изчезване от повърхността на електрода. Нарушеният пермеабилитет на мембраната се дължи на непрекъснатото подреждане на липидния бислой от присъствието на NPs. При най-голямата си концентрация CS NP могат да проникнат дълбоко в мембраната, създавайки локални деформации и временни пори, причинявайки наблюдаваното свиване на везикулите и отделянето на липид-NP агрегати в подмикронната област.

В експерименталните условия с GUVs моделите наблюдавахме адхезия, сливане, свиване и пълна дезинтеграция на везикулите при определени концентрации на CS NPs. Това явление частично се потвърждава от експериментите с LUVs, при които профилът на разпределение на размера на LUVs се увеличава в изследвания концентрационен диапазон на CS NPs. В DLS профила на третираните LUVs не беше наблюдаван пик на разпределение, изместен към по-малки размери от тези на нетретираните LUVs, което би могло да съответства на образуване на малки везикули или мицели (дезинтеграция на везикулите). Разликите в размера, повърхностното напрежение и кривината между GUVs и LUVs са критичен фактор, който може да повлияе на взаимодействията между NMs и мембраните, включително афинитета на свързване, проникването, дестабилизацията на липидния бислой от NMs и др.

CS NPs предизвикват морфологични промени в хетерогенни GUVs (EggPC/EggSM/Chol), показващи  $L_d/L_o$  фазово ко-съществуване, но при 2 пъти по-висока концентрация (160  $\mu\text{g/ml}$ ). Наблюдаваха се два вида морфологични трансформации в хетерогенните GUVs – вътрешни мембранни инвагинации и постепенно свиване на GUVs през  $L_d$  фаза. Както бе дискутирано при резултатите с LUVs, съдържанието на Chol оказва влияние върху взаимодействието на мембраната с катионните NMs. Количеството Chol намалява отрицателният повърхностен заряд на мембраната и оттам електростатичното взаимодействие с катионните NPs. CS NPs взаимодействат предимно с  $L_d$  фаза чрез увеличаване на нейната липидна подреденост. Над определена критична концентрация на CS NPs, в случая 160  $\mu\text{g/ml}$ , неравномерното

разпределение на NP по цялата повърхност на мембраната и тяхното различно въздействие върху подредането на липидите на двете съвместно съществуващи фази задействат наблюдаваните навътре мембранни инвагинации и дезинтеграция на мембраната.

## **V.2. Биоактивност на CS-базираните HNCs срещу фитопатогенни гъби**

Биоактивността на новосинтезирани CS-базирани HNCs, съдържащи ZnO, CuO, SiO<sub>2</sub>, бе изследвана срещу едни от най-важните фитопатогенни гъби – *Alternaria solani* и *Fusarium solani*. С помощта на комбинация от микробиологични, биохимични и биофизични подходи бе установена ефикасна антифунгална активност и бяха изяснени ключови механизми на антифунгално действие.

### **V.2.1. Антифунгална активност на CS-базираните HNCs. Ефекти върху *A. solani* и *F. solani***

Новосинтезираните CS-базирани HNCs са съставени от високо ефективни компоненти със силно изразени антифунгални активности. Много проучвания установяват антифунгален ефект от различни CS NMs срещу фитопатогенни гъби като *Rhizopus sp* [17], *Colletotrichum capsica* [18], *F. graminearum*, както и *Botrytis cinerea* [19]. Силата на тази активност зависи от DD и MW на CS, тъй като определят размерите на NMs и големината на катионния заряд [17, 20]. Освен CS, металните оксиди, ZnO и CuO, също демонстрират впечатляваща антифунгална активност срещу важни патогени като *Botrytis cinerea* [21], *Penicillium expansum* [22], и *Fusarium oxysporum* [23]. В допълнение, скорошни изследвания установяват силен инхибиторен ефект и на SiO<sub>2</sub> NPs срещу селскостопански фитопатогенни гъби [24, 25].

Химичното комбиниране на органичния CS с неорганичните оксиди (ZnO, CuO и SiO<sub>2</sub>), представлява иновативен подход за създаване на стабилни и антифунгални HNCs. Това е доказана ефективна стратегия за засилване на активността на CS и неорганичните оксиди, в резултат, на което сеполучава синергична антифунгална активност [26]. Също така, едно голямо предимство на тези HNCs е доказаната биосъвместимост на двата компонента като те не създават нежелани рискове за растенията и околната среда. CS е особено ценен благодарение на своята биоразградимост и доказани растеж-стимулиращи активности върху растителната продукция [27]. От своя страна, CuO и ZnO са добре известни в селското стопанство като ефективни фертилизатори, подпомагащи растежа и развитието на селскостопанските растения [28, 29].

Въпреки наличието на изключително активни компоненти в CS-базираните HNCs, тяхната ефективност в голяма степен зависи от комбинацията на физикохимичните им характеристики, като размер, форма и повърхностен заряд. NMs със сферична форма демонстрират силен антифунгален ефект, тъй като те интернализират по-бързо и по-ефективно във фунгалните клетки [4, 30]. Размерът на NMs също е ключов фактор, който оказва влияние върху тяхната активност. Например, NMs с малки размери (между 40 и 100 nm) показват силен

антифунгален ефект и ефективно инхибират растежа на фунгалния мицел и спорите [31 - 33]. Малкият размер на NMs осигурява високо съотношение повърхност-обем, което прави повърхността им много реактивна и улеснява взаимодействията с клетъчните повърхности на гъбите [8, 34]. Много малките NMs могат да индуцират нанотоксичност чрез нарушаване на целостта на клетъчните мембрани - лизис на фунгалните клетки [35].

Повърхностният заряд на наноматериалите играе ключова роля във взаимодействията им с фунгалните клетъчни повърхности и важни клетъчни компоненти. Изследванията показват, че положително заредените NMs проявяват много по-силна антифунгална активност в сравнение с отрицателно заредените [36, 37]. Клетъчните стени на гъбите имат отрицателен повърхностен заряд заради наличието на фосфорилираните манозилови остатъци по повърхността [38]. Това води до електростатично привличане на положително заредените NMs към отрицателно заредените повърхности на гъбите, насърчавайки ефективната адсорбция, интернализация и последващи взаимодействия [39].

CS-базираните HNCs са синтезирани с цел постигане на висока антифунгална активност. Получените HNCs отговарят на критериите за ефективно антифунгално действие. Те имат сферична форма с високи положителни  $\zeta$  - потенциали от +22 до +30 mV и малки средни размери в диапазона от 65 до 167 nm. В процеса на приготвяне на HNCs се извършва допълнителен етап на протониране, последвано от лиофилизация, за да се гарантира максимална протонация на амино групите на CS и тяхното ефективно диспергиране в DMSO. Това осигурява по-малки колоидни размери и по-голям положителен заряд, които могат да допринесат за по-висока токсичност при взаимодействие с фунгалните клетки. От получените резултати от агар дифузионния метод се установи, че тестваните CS-базирани HNCs демонстрират силен антифунгален ефект срещу фитопатогенните гъби, *A. solani* и *F. Solani*, надвишавайки дори ефекта на нистатина, широко използван мощен фунгицид. HNCs показаха успешно инхибиране на мицелния растеж при концентрация от 200  $\mu$ l/ямка с продължителна активност до 72 h след третиране. От двата щама, *A. solani* се оказа по-чувствителен към HNCs в сравнение с *F. solani*. Сред тестваните HNCs, CS-ZnO HNCs показва най-мощен антифунгален ефект с индуциране на големи инхибиторни зони и при двата фунгални щама.

## **V.2.2. Механизъм на антифунгална активност на CS-базираните HNCs**

### **V.2.2.1. Индуциране на ROS и OS**

Сред всички предложени механизми, обясняващи антифунгалната активност на NMs, способността им да индуцират високи нива на OS е един от най-значимите и задълбочено проучваните. Екзогенно индуцираните ROS предизвикват необратими увреждания на редица клетъчни компоненти, включително ДНК, белтъци и липиди, водещи до сериозни нарушения в клетъчната хомеостаза и в крайна сметка до клетъчна смърт.

Установено е, че поради поликатионната си природа CS може да индуцира високи нива на ROS и последваща клетъчна смърт на редица фунгални видове [40, 41]. Като поликатион, CS в определени нано формулировки може да показва прооксидантна активност [42] и да индуцира образуването на ROS директно или индиректно. Точният механизъм, обаче, по който CS генерира ROS, все още не е изяснен. Изследвания върху *N. crassa* например, твърдят, че CS-индуцираните нива на ROS са свързани с мембранна пермеабилитация. При третиране с CS, тази гъба показва увеличен метаболитен отговор към ROS посредством активация на гени, свързани с хомеостаза на клетъчната мембрана [43]. В допълнение, CS може да действа и като хелатиращ агент, свързвайки се към хранителни вещества и минерали в средата, водещо до гладуване на фунгалните клетки, смущения в метаболизма и потенциално генериране на OS [44].

От друга страна обаче, металните оксиди като ZnO и CuO имат ясно доказани механизми на генериране на OS в клетките. Те се открояват със силни прооксидантни активности и могат да генерират ROS посредством разнообразни механизми. Един такъв е редокс-повърхностната катализа. Кристалната наноструктура на ZnO, CuO, допринася за голям брой силно реактивни структурни дефекти по повърхността, където молекули  $O_2$  могат да се редуцират до супероксиден анион  $O_2^{\cdot -}$  (Фиг. 1) [45, 46]. Той, от своя страна, може да повиши значително нивата на активна SOD и да предизвика генерирането на други токсични видове ROS като  $H_2O_2$  и хидроксилен радикал  $OH^{\cdot}$  [46]. Освен това, ZnO може да освобождава  $Zn^{+2}$  йони, които предизвикват метаболитни смущения, деактивация на ензими и нарушение в йонната хомеостаза потенциално състояние на OS в клетките [47].

За оценка на прооксидантната активност на CS-базираните HNCs, бе проведено дълбочинно култивиране на *F. solani* и *A. solani* с HNCs. Получените резултати от SOD активност, нива на MDA и количество PCC недвусмислено доказаха наличие на OS във фунгалните клетки. Металоензимът SOD играе централна роля в антиоксидантната защита на клетките срещу ROS, като дисмутира  $O_2^{\cdot -}$  до  $H_2O_2$  и  $O_2$  (Фиг. 21) [48]. Повишените нива на SOD са силен маркер за наличието на  $O_2^{\cdot -}$  във вътреклетъчното пространство и за наличие на OS. В клетките на *F. solani*, нивата на SOD бяха повишени в отговор на всички тествани HNCs. Сред тях CS-CuO HNCs демонстрира най-мощтен ефект дори при най-ниската тествана концентрация от 0.5 mg/ml. При *A. solani* обаче, SOD активността бе повлияна единствено от CS-SiO<sub>2</sub> HNCs. По-ниските нива на SOD и липсата на такива от другите HNCs в клетките на *A. solani* е индикация за бързо дисмутиране на  $O_2^{\cdot -}$  от SOD.

Освен активация на антиоксидантните системи в клетките, високи нива на OS индуцират редица клетъчни увреждания. Клетъчната мембрана например, е една от най-уязвимите компоненти, които могат да станат прицел на оксидативно увреждане от ROS. Основният и най-токсичен радикал, който може да индуцира процес на LP е  $OH^{\cdot}$  [49]. Ключов маркер за детекция на LP в клетките е алдехида MDA, тъй като е един от основните вторични продукти от

оксидативно увреждане на мембранните МК [50]. От получените резултати се установи, че всички тестваните CS-базирани HNCs предизвикват ясно дозозависимо увеличаване на количеството MDA в клетките и на двата щама. Оказа се, че мембраните на *F. solani* са по чувствителни към CS-CuO HNCs, а тези на *A. solani* към CS-SiO<sub>2</sub> HNCs, съдейки по индуцираните от тях нива на MDA.

Високите нива на OH<sup>•</sup> в клетките довежда и до карбонилиране на аминокиселинни остатъци в клетъчните белтъци, чрез добавяне на кетони или алдехиди в тяхната нативна структура. Това от своя страна нарушава белтъчната структура и функции, което води до потенциално омрежване, фрагментация, денатурация и протеолизис. Освен това, повишените нива на PCC в клетките могат да бъдат вследствие на взаимодействие с вторични алдехиди от LP, включително и MDA, които взаимодействат с аминокиселинни остатъци и предизвикват тяхното карбонилиране [51, 52]. Получените резултати показват, че PCC нивата в двата щама се увеличават значително в отговор на всички тествани HNCs. В клетките на двата щама най-високи нива на PCC са отчетени след третиране с CS-CuO HNCs.

От получените резултати се установява, че *F. solani* е по-чувствителен към прооксидантната активност на CS-базирани HNCs със значително повишени нива на всички измерени маркери за OS. Най-голяма чувствителност се установява към действието на CS-CuO HNCs. CuO е изключително токсичен за фунгалните клетки. Активността на CuO, освен с редокс-повърхностна катализа, се основава и на освобождаването на Cu<sup>+</sup> и Cu<sup>2+</sup>, участващи във Фентон-подобни реакции и реакции на Хабер-Вайс, водещи до високи нива на OH<sup>•</sup> в клетките (Фиг. 2) [45, 47, 53]. Тези силно токсични радикали окисляват белтъци и МК в мембранните липиди [114], което се свързва с повишените нива на MDA и PCC. Освен това, редуцираната Cu<sup>+</sup> и окислената Cu<sup>2+</sup> форма могат да участват в редокс циклични реакции с липидни хидроперокси (LOOH) по време на LP, което засилва процеса на пероксидация и води до още по-сериозни увреждания в мембраните (Фиг. 32 (5,6)) [50].

При *A. solani* най-силният ефект се наблюдава от CS-SiO<sub>2</sub> HNCs, което води до най-високи нива на активна SOD и MDA. Тази силна прооксидантна активност на SiO<sub>2</sub> вероятно се дължи на наноструктурната организация на SiO<sub>2</sub> в състава на HNCs. Въпреки че SiO<sub>2</sub> е аморфен и инертен, с намаляване на размерите, оксидът придобива прооксидантни свойства. Установено е, че колкото по-малък е размерът на NPs, толкова по-голяма е вероятността за образуване на ROS и състояния на OS в клетките [8]. Причината за това е увеличаването на броя на силно реактивни структурни дефекти по повърхността на частиците, които променят редокс потенциала на оксида към стойности, съответстващи на биологичния. Това прави повърхността на SiO<sub>2</sub> NPs по-реактивна и способна да участва в редокс-повърхностна катализа [45]. Макар и по-бавна от Фентон и Хабер-Вайс реакциите, тази катализа води до продължително редуциране на кислорода и високи нива на ROS в клетките.

Важно е да се отбележи, че въпреки силно прооксидантните оксиди в състава на тези HNCs, повърхностният заряд е фактор, който води до състояния на OS във фунгалните клетки. Всички CS-базирани HNCs са катионни с високи стойности на  $\zeta$  - потенциалите от +22 до +30 mV. Установено е, че катионните NMs предизвикват много високи нива на ROS, в резултат на електростатични взаимодействия с клетъчни компоненти, което променя техния редокс потенциал и нарушава техните функции [54].

#### **V.2.2.2. Промени в липидната организация на фунгалните мембрани, индуцирани от CS-базирани HNCs**

Промените в липидната подреденост на фунгалните мембрани след третиране с CS-базирани HNCs бяха оценени чрез изчисляване на общата поляризация, подобно при LUVs. Изследването на тези промени е ключов аспект от механизма на действие на HNCs, тъй като мембраната е първата мишена на тяхното въздействие. Промените в липидната подреденост на мембраната водят до нарушения в нейната пропускливост и интегритет, което е пряко свързано с нанотоксичната активност на материалите.

Получените резултати показват, че наблюдаваната антифунгална активност на изследваните CS-базирани NCs е съпроводена с изменения в подредеността на фунгалните мембрани и при двата щама. Контролните GP стойностите на гъбичните мембрани бяха високи и положителен (*F. solani* – GP = 0.224 и *A. solani* – GP = 0.126), което показва, че гъбичните мембрани са подредени мембрани. Клетъчните мембрани на гъбите са съставени от ергостерол, сфинголипиди и глицерофосфолипиди [55], като техният специфичен мастнокиселинен състав придава определена степен на подреденост при нормални условия. След третиране с CS-базирани HNCs се наблюдава значителна промяна в организацията на мембраните с изразена тенденция към нарастване на липидната подреденост. Най-големи количествени промени върху мембраните на *F. solani* се наблюдава от CS-CuO HNCs, а върху *A. solani* от CS-SiO<sub>2</sub> HNCs.

Установените механизми на действие на CS-базирани HNCs върху мембранните модели могат да бъдат приложени за интерпретация на получените резултати с фунгалните мембрани. Увеличената липидна подреденост в моделните мембрани беше установено, че се дължи на електростатични взаимодействия, адхезия върху мембранната повърхност, намаляване на полярността около глицероловия скелет и възможни хидрофобни взаимодействия с бислоя. Физикохимичните характеристики на антифунгалните CS-базирани HNCs (размери 65–167 nm и  $\zeta$  - потенциал от +22 до +30 mV) благоприятстват такъв тип взаимодействия с клетъчните мембрани на гъбите, довеждащ до подреждане. Въпреки че тези механизми са изведени на база експериментални резултати с опростени модели, корелация в ефектите върху моделните мембрани и фунгалните мембрани може да се установи. Тази корелация показва ясна тенденция в увеличаване на липидната подреденост на мембраните при взаимодействия с такъв тип катионни HNCs. Това, от своя страна, валидира значимостта на мембранните модели като

надеждни системи за оценка на биоактивността на различни видове NMs. Въпреки липсата на протеинови компоненти, тези модели са ценни за установяване на тенденции на взаимодействията и демонстрират ключовата роля на липидния компонент в мембраната при контакт с екзогенни молекули, включително NMs.

Резултатите, свързани с промените в липидната подреденост, ясно показват, че HNCs влизат в директен контакт с фунгалните мембрани. Една от основните характеристики на фунгалните клетки е наличието на клетъчна стена. Въпреки това, тя очевидно не възпрепятства навлизането на HNCs и установяването на контакт с клетъчните мембрани. Отрицателният заряд на клетъчната стена може да стимулира електростатичното привличане с катионните NMs [164]. Научни изследвания сочат, че CS може да преминава през клетъчната стена на гъбите и да взаимодейства с отрицателно заредените фосфолипиди в мембраната [56, 57]. Този процес може да бъде съпроводен и с нарушаване на интегритета на клетъчната стена. В подкрепа на това, изследвания върху *S. cerevisiae* показват повишена експресия на гени, свързани с регулацията на клетъчната стена, в отговор на третиране с CS [58], което от своя страна допринася за антифунгалната активност на CS NMs.

Способността на антифунгалните агенти да преминават през клетъчната стена и плазмената мембрана на гъбите е ключов фактор, определящ тяхната ефективност. Резистентността сред патогенните гъби се медира от различни механизми, включително промени в таргетното място на действие, детоксикация или инактивация на активното вещество, свръхекспресия на таргетни протеини и активен транспорт чрез ефлуксни помпи [59]. Съществено значение имат и адаптивните изменения в състава и организацията на клетъчната стена и мембранный бислой, които могат да ограничат проникването и вътреклетъчното натрупване на антифунгални агенти. Например, повишеното съдържание на хитин и глюкани сред резистентни щамове води до уплътняване на клетъчната стена, затруднявайки достъпа на външни агенти до клетъчната мембрана [60, 61]. От своя страна, измененията в липидния състав на мембраната, включително вариации в съдържанието на ергостерол, влияят върху нейната подреденост, флуидност и пропускливост, като по този начин модулират взаимодействието с антифунгални съединения и наноматериали [62]. В този контекст установените взаимодействия между изследваните CS-базирани HNCs и фунгалните мембрани, както и съпътстващите изменения в липидната подреденост, показват, че антифунгалната активност се осъществява чрез механизъм, включващ директно въздействие върху мембранната организация, което представлява алтернативен подход за преодоляване на резистентността сред фитопатогените.

## VI. Заключение

С помощта на мембранни модели, възпроизвеждащи хетерогенността на еукариотните мембрани, бяха изяснени ключови биофизични и физикохимични принципи на взаимодействие на CS-базирани и PEG-базирани HNCs с биомембрани. Въз основа на получените резултати се установи, че ново синтезираните CS NPs, CS-базирани HNCs с CuO, ZnO и SiO<sub>2</sub> и PEG-ZnO HNCs взаимодействат с различни мембранни липиди и различни липидни фази като индуцират промени в липидната организация, съпроводени с морфологични изменения в мембраните. Електростатичните сили на привличане играят ключова роля във взаимодействията между катионните NMs и мембраните, съставени от цвтерийонни липиди със слаб електроотрицателен повърхностен заряд. Тези взаимодействия улесняват различни механизми, включително адсорбция на NMs върху мембранната повърхност, формиране на водородни връзки с полярните липидни глави, хидрофобни взаимодействия и дори проникване в бислоя. В резултат на тези процеси NMs повишават подредеността на липидните фази като намаляват полярността в областта на глицероловия скелет на липидите. Най-изразени количествени промени се наблюдават във високо флуидната и полярна L<sub>d</sub> фаза, следвана от фазовото съвместно съществуване L<sub>d</sub>/L<sub>o</sub>, докато силно подредената рафт-подобната L<sub>o</sub> фаза демонстрира най-слаби изменения. Наличието на холестерол в мембраните значително намалява полярността и електроотрицателния повърхностен заряд на бислоя. Това допринася за по-слаби взаимодействия на катионните NMs с L<sub>d</sub>/L<sub>o</sub> и L<sub>o</sub> фазите. Установи се, че колкото по-неподреден и полярен първоначално е липидният бислой, толкова по-силно проявен ще бъде подреждащия ефект на изследваните HNCs. Увеличената липидна подреденост в хомогенни L<sub>d</sub> и хетерогенни L<sub>d</sub>/L<sub>o</sub> мембрани, индуцирана от NMs, са съпроводени с изменения в пермеабилитета на бислоя, мембранни инвагинации и нарушаване на интегритета на мембраната. Установи се ясна корелация между специфичните взаимодействия на NMs с мембраните и техните физикохимични характеристики като повърхностен заряд и размери. Най-силни взаимодействия се наблюдават при CS NPs (38 nm, +34mV), а най-слаби при PEG-ZnO HNCs (1.1 μm, +10 mV). Резултатите показват, че колкото по-малки са колоидните размери на NMs и колкото по-положително заредени са те, толкова по-изразени са наблюдаваните ефекти върху мембраните и ще са необходими по-ниски концентрации за постигане на наблюдаваните изменения в мембраните.

Биоактивността на ново синтезирани CS-базирани HNCs, съдържащи ZnO, CuO, SiO<sub>2</sub>, бе оценена срещу едни от икономически значимите фитопатогенни гъби – *Alternaria solani* и *Fusarium solani*. Въз основа на получените резултати се установи, че всички CS-базирани HNCs демонстрират ефикасна и продължителна антифунгална активност. Най-силен инхибиторен ефект върху мицелния растеж при двата щама бе установен от CS-ZnO HNCs. Тези резултати

показват, че комбинирането на CS с неорганичните оксиди е иновативен подход за синтез на антифунгални HNCs със синергични активности и ефективни физикохимични характеристики. Комбинацията от сферична морфология, малки размери (65 – 167 nm) и поликатионна природа (+22 - +30 mV) благоприятстват силни взаимодействия на CS-базираните HNCs с отрицателно заредените клетъчни повърхности на гъбите, водят до ефективна и бърза интернализация в клетките и индуцират нанотоксичност. С помощта на биохимични и биофизични подходи се установи, че молекулните механизми на антифунгалното действие на HNCs се основават на генериране на оксидативен стрес в клетките и индуциране на промени в липидната организацията на фунгалните мембрани. Всички CS-базирани HNCs демонстрират силна прооксидантна активност, отразена в повишени нива на супероксидна дисмутаза (SOD), индуциране на липидна пероксидация и карбонилиране на клетъчни белтъци. Наличието на тези маркери разкрива генериране и натрупване на необратими оксидативни увреждания във важни клетъчни компоненти и молекули. *F. solani* показва по-силна чувствителност към активност на CS-CuO HNCs, а *A. solani* към CS-SiO<sub>2</sub> HNCs. Прооксидантната активност на CS-базираните HNCs се дължи на наноструктурната организация на ZnO, CuO и SiO<sub>2</sub>, генериращи високи нива на ROS посредством множество механизми, включително освобождаване на метални йони, редокс-повърхностна катализа, Фентон-подобни реакции, реакции на Хабер-Вайс. Освен с предизвикване на състояние на оксидативен стрес, антифунгалната активност на NMs е съпроводена и с промени в мембранната подреденост при двата фунгални щама. Малките размери и катионната повърхност на HNCs улесняват преминаването им през отрицателно заредена клетъчна стена на гъбите и влизат в директен контакт с фосфолипидния компонент на клетъчните мембрани. Взаимодействието между HNCs и мембраните индуцира промени в липидната подреденост, в резултат на което гъбичните мембрани стават по-податливи на структурни и функционални увреждания, което подчертава мембранно-насочения характер на антифунгалното действие и потенциала на тези наноматериали като алтернативен подход при резистентни гъбични щамове.

Настоящият труд допринася не само с приложни перспективи, но и със съществен фундаментален принос към разбирането на механизмите на взаимодействие между хибридни наноматериали и биологични мембрани. Изяснени са ключови биофизични и физико-химични зависимости между повърхностните характеристики на наноматериалите, липидната организация и индуцирания оксидативен стрес, което разширява познанията за мембранно-медираните механизми на нанотоксичността на изследваните материали. Получените резултати подчертават значителния потенциал на CS-базираните хибридни нанокomпозити като ново поколение антифунгални материали с комбиниран мембранно-увреждащ и прооксидантен механизъм на действие. Тези материали могат да намерят приложение като алтернатива или допълнение към конвенционалните антифунгални средства в растителната защита за контрол на

фитопатогенни гъби, както и при разработването на функционални покрития, биосъвместими наноматериали и антимикробни системи, насочени към преодоляване на нарастващата резистентност и намаляване на необходимите активни концентрации.

## VII. Изводи

1. Синтезираните CS NPs, CS-базирани HNCs с CuO, ZnO и SiO<sub>2</sub> и PEG-ZnO HNCs взаимодействат с различни мембранни липиди и различни липидни фази като индуцират специфични изменения в моделните мембрани.
2. Електростатичните сили на привличане между катионните NMs и мембраните, съставени от цвтерийонни липиди със слаб електроотрицателен повърхностен заряд, промотират различни механизми на ключови взаимодействия, включително адхезия на NMs върху мембранната повърхност, формиране на водородни връзки с полярните липидни глави, хидрофобни взаимодействия и проникване в липидния бислоя.
3. Тестваните NMs повишават подредеността на всички липидни фази, намалявайки полярността в областта на глицероловия скелет на липидите като този ефект е зависим от първоначаланата липидна подреденост и полярност на бислоя.
4. Най-изразени количествени промени се наблюдават във високо флуидната и полярна L<sub>d</sub> фаза, а най-слаби върху силно подредената рафт-подобна L<sub>o</sub> фаза. Наличието на холестерол в мембраните намалява полярността и електроотрицателния повърхностен заряд на бислоя, промотирайки по-слаби взаимодействия с катионните NMs.
5. Увеличената липидна подреденост в хомогенни L<sub>d</sub> и хетерогенни L<sub>d</sub>/L<sub>o</sub> мембрани, индуцирана от NMs, са съпроводени с изменения в пермеабилитета на бислоя, мембранни инвагинации и дезинтеграция на мембраната.
6. Съществува ясна взаимовръзка между наблюдавани ефекти върху мембраните и физикохимични характеристики на NMs. Най-силни взаимодействия се установяват при CS NPs (38 nm, +34mV), а най-слаби при PEG-ZnO HNCs (1.1 μm, +10 mV). Колкото по-малки са колоидните размери на NMs и колкото по-положително заредени са те, толкова по-изразени са наблюдаваните изменения в мембраните и ще са необходими по-ниски концентрации за постигане на тези ефекти.
7. CS-базирани HNCs демонстрират ефективна и продължителна (до 72 h) антифунгална активност срещу фитопатогенните гъби *Alternaria solani* и *Fusarium solani*. Най-силен инхибиторен ефект върху мицелния растеж на двата щама е установен от CS-ZnO HNCs.
8. Комбинацията на CS с неорганичните оксиди е иновативен подход за синтез HNCs със синергични антифунгални активности и ефективни физикохимични характеристики, включително сферична морфология, малки размери (65 – 167 nm) и поликатионна повърхност (+22 - +30 mV).

- 9.** Антифунгалното действие на CS-базираните HNCs се реализира чрез индуциране на оксидативен стрес в клетките на изследваните фитопатогени. Тестваните CS-базирани HNCs демонстрират силна прооксидантна активност, изразена чрез повишени нива на SOD, липидна пероксидация и карбонилиране на клетъчни белтъци.
- 10.** Взаимодействието между HNCs и мембраните индуцира промени в липидната подреденост, подчертаващо мембранно-насочения характер на антифунгалното действие и потенциала на тези наноматериали като алтернативен подход при резистентни гъбични щамове.

## VIII. Приноси

Научните приноси на представения дисертационен труд могат да бъдат формулирани като приноси с научен (1 - 4) и научно-приложен характер (5, 6).

1. Предложен е молекулен механизъм на взаимодействие, включващ систематизирани биофизикохимични закономерности на взаимодействие между катионни CS-базирани и PEG-базирани HNCs и различни мембранни липиди и липидни фази в моделни еукариотни мембрани.
2. Извършен е комплексен биофизикохимичен анализ на CS-базирани и PEG-базирани хибридни нанокompозити, като са идентифицирани критични параметри (размер, повърхностен заряд и морфология), определящи тяхното взаимодействие с моделни и биологични мембрани.
3. За първи път количествено са охарактеризирани дзета-потенциалът и мембранната подреденост в хомогенни и хетерогенни моделни мембрани, третирани с CS- и PEG-базирани нанокompозити, като са визуализирани индуцираните от тях морфологични трансформации.
4. За първи път е установено, че антифунгалната активност на CS-базирани хибридни нанокompозити спрямо *Alternaria solani* и *Fusarium solani* се реализира чрез комбиниран механизъм, включващ индуциране на оксидативен стрес и съществени изменения в липидната организация на фунгалните мембрани.
5. Доказана е корелация между физикохимичните характеристики на наноматериалите, тяхната антифунгална активност и индуцираните мембранни и оксидативни увреждания във фунгалните клетки на *Alternaria solani* и *Fusarium solani*, което позволява прогнозиране и целенасочена оптимизация на тяхната антифунгална ефективност.
6. Положена е научна основа за бъдещо приложение на CS-базирани хибридни нанокompозити като ефективни и екологично ориентирани антифунгални материали за контрол на фитопатогенните гъби *Alternaria solani* и *Fusarium solani* в селското стопанство, с потенциал за използване в растителната защита и разработване на устойчиви нанопестициди срещу резистентни щамове.

## Научни публикации по дисертационния труд:

Една публикация като първи автор:

1. **Benkova, D.**, Dishliyska, V., Staleva, J. M., Kostadinova, A., Staneva, G., El-Sayed, Kh., Elshoky, H. A., Krumova, E. (2024). CS and ZnO Nanoparticles as Fungicides Against Fungal Pathogens *Alternaria solani* and *Fusarium solani*. Mechanism Underlining Their Antifungal Activity. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, 77(7), Marin Drinov, BAS, 986-996, (Scopus):0.16, JCR-IF (Web of Science): 0.3, Q3 (Scopus). <http://dx.doi.org/10.7546/CRABS.2024.07.05>

Две публикации със споделено първо авторство:

2. Kostadinova, A., **Benkova, D.**, Staneva, G., Hazarosova, R., Vitkova, V., Yordanova, V., Momchilova, A., Angelova, M. I., ElZorkany, H. E., El-Sayed, Kh., Elshoky, H. A. (2024). Chitosan hybrid nanomaterials: A study on interaction with biomimetic membranes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 276, Elsevier, 133983. SJR (Scopus):1.245, JCR-IF (Web of Science):7.7, Q1 (Scopus). <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133983>
3. Krumova, E., **Benkova, D.**, Stoyancheva, G., Dishliyska, V., Miteva-Staleva, J., Kostadinova, A., Ivanov, K., El-Sayed, Kh., Staneva, G., Elshoky, H. A. (2024). Exploring the mechanism underlying the antifungal activity of chitosan-based ZnO, CuO, and SiO<sub>2</sub> nanocomposites as nanopesticides against *Fusarium solani* and *Alternaria solani*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 268, Elsevier, 2024, 131702. SJR (Scopus):1.245, JCR-IF (Web of Science):7.7, Q1 (Scopus). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131702>

## Участия в научни форуми:

### Участия в международни научни форуми:

1. Доклад на тема **“Newly synthesized chitosan nanoparticles and chitosan-based nanocomposites as a promising bionanopesticides: A detailed approach of understanding the molecular mechanism of their antifungal activity”**  
D. Benkova, A. Kostadinova, G. Staneva, K. Ivanov, V. Dishliyska, J. Miteva-Staleva, E. Krumova.  
XXXIII Международна Online научна конференция, Стара Загора, България, 01 - 02.06.2023.
2. Постер на тема **“Chitosan-Based Nanomaterials as Promising Bionanopesticides: An Approach of Understanding the Mechanism behind Their Antifungal Activity”**  
D. Benkova, A. Kostadinova, G. Staneva, K. Ivanov, V. Dishliyska, J. Miteva-Staleva, E. Krumova  
Data-Driven Models for Living Systems, Sofia, Bulgaria, 08 - 09.06.2023.
3. Доклад на тема **“Interactions of chitosan-based hybrid nanomaterials with biomimetic models of cell plasma membrane”**  
D. Benkova, A. Kostadinova, H. A. Elshoky, R. Hazarosova, V. Yordanova, G. Staneva  
8th International Symposium on Phospholipids in Pharmaceutical Research, Heidelberg, Germany, 09 - 11.09.2024.

### Участия в национални научни форуми:

4. Постер на тема **“Chitosan-based nanomaterials as nanopesticides against *Alternaria solani* and *Fusarium solani*”**  
D. Benkova, A. Kostadinova, G. Staneva, K. Ivanov, V. Dishliyska, J. Miteva-Staleva, E. Krumova  
Синергията между науката и бизнеса: настояще и перспективи, София, България, 20 - 20.11.2023.
5. Доклад на тема **“Antifungal Activity of Chitosan-Based Nanomaterials against *Alternaria solani*. Can They Be Reliable and Effective Bionanopesticides?”**  
D. Benkova, A. Kostadinova, V. Dishliyska, J. Miteva-Staleva, Y. Yan, Y.-S. Liu, K. Ivanov, G. Staneva, H. Elshoky, E. Krumova  
Четвърта младежка научна сесия „Биомедицина и качество на живот“, София, България, 05 - 06.12.2023.

**6. Доклад на тема “Chitosan-based hybrid nanomaterials: Interactions with biomimetic membranes”**

D. Benkova, A. Kostadinova, R. Hazarosova, V. Yordanova, H. A. Elshoky, G. Staneva

Четвърти национален конгрес по физически науки, София, България, 07 - 09.10.2024.

## **Лични научни награди по дисертационния труд:**

### **1. Грамота за отлично представен доклад на млад учен**

Четвърти национален конгрес по физически науки, София, България, 07 - 09 октомври 2024 година.

Тема на доклада „Хитозан-базирани хибридни наноматериали: Взаимодействие с биомиметични мембрани“.

### **2. Награда за най-млади учени „Иван Евстратиев Гешов” на Българската академия на науките**

Научно постижение на тема „Биоактивност на ново синтезирани хитозан-базирани наноматериали“, Научно направление 4 - Биомедицина и качество на живот, София, България, 23 май 2025 година.

## Цитирана литература:

1. Pokorná, S., Ventura, A. E., Santos, T. C. B., Hof, M., Prieto, M., Futerman, A. H., & Silva, L. C. (2022). Laurdan in live cell imaging: Effect of acquisition settings, cell culture conditions and data analysis on generalized polarization measurements. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 228, 112404. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2022.112404>
2. Orlikowska-Rzeźnik, H., Krok, E., Chattopadhyay, M., Lester, A., & Piątkowski, L. (2023). Laurdan discerns lipid membrane hydration and cholesterol content. *Journal of Physical Chemistry B*, 127(15), 3382–3391. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.3c00654>
3. Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
4. Li, Y., Kröger, M., & Liu, W. K. (2015). Shape effect in cellular uptake of PEGylated nanoparticles: Comparison between sphere, rod, cube and disk. *Nanoscale*, 7(41), 16631–16646. <https://doi.org/10.1039/C5NR02970H>
5. Palma-Guerrero, J. A., Lopez-Jimenez, A. J., Pérez-Berná, I.-C., Huang, H.-B., Jansson, J., Salinas, J., Villalafín, N. D., Read, L. V., & Lopez-Llorca, L. V. (2010). Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. *Molecular Microbiology*, 75(5), 1021–1032. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07039.x>
6. Mady, M. M., Darwish, M. M., Khalil, S., & Khalil, W. M. (2009). Biophysical studies on chitosan-coated liposomes. *European Biophysics Journal*, 38(8), 1127–1133. <https://doi.org/10.1007/s00249-009-0524-z>
7. Wydro, P., Krajewska, B., & Hac-Wydro, K. (2007). Chitosan as a lipid binder: a langmuir monolayer study of chitosan-lipid interactions. *Biomacromolecules*, 8(8), 2611–2617. <https://doi.org/10.1021/bm700453x>
8. Gato, M. A., Naseem, S., Arfat, M. Y., Dar, A. M., Qasim, K., & Zubair, S. (2014). Physicochemical properties of nanomaterials: implication in associated toxic manifestations. *BioMed Research International*, 2014, 498420. <https://doi.org/10.1155/2014/498420>
9. Clogston, J. D., & Patri, A. K. (2011). Zeta potential measurement. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 697, 63–70. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6)
10. Rad, I., Khodayari, K., Alijanvand, S. H., & Mobasheri, H. (2015). Interaction of polyethylene glycol (PEG) with the membrane-binding domains following spinal cord injury (SCI): Introduction of a mechanism for SCI repair. *Journal of Drug Targeting*, 23(1), 79–88. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2014.956668>
11. Jiang, Y., Huo, S., Mizuhara, T., Das, R., Lee, Y. W., Hou, S., Moyano, D. F., Duncan, B., Liang, X. J., & Rotello, V. M. (2015). The Interplay of Size and Surface Functionality on the Cellular Uptake of Sub-10 nm Gold Nanoparticles. *ACS nano*, 9(10), 9986–9993. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b03521>
12. Magarkar, A., Dhawan, V., Kallinteri, P., Viitala, T., Elmowafy, M., Róg, T., & Bunker, A. (2014). Cholesterol level affects surface charge of lipid membranes in saline solution. *Scientific reports*, 4, 5005. <https://doi.org/10.1038/srep05005>
13. Quemeneur, F., Rinaudo, M., & Pépin-Donat, B. (2008). Influence of polyelectrolyte chemical structure on their interaction with lipid membrane of zwitterionic liposomes. *Biomacromolecules*, 9(8), 2237–2243. <https://doi.org/10.1021/bm800400y>
14. Contini, C., Hindley, J. W., Macdonald, T. J., Barritt, J. D., Ces, O., & Quirke, N. (2020). Size dependency of gold nanoparticles interacting with model membranes. *Communications chemistry*, 3(1), 130. <https://doi.org/10.1038/s42004-020-00377-y>
15. Martin, C. S., Maximino, M. D., Martins, J. F. V. A., Pazin, W. M., & Constantino, C. J. L. (2024). Exploring the effects of silver, silica-coated silver, and gold nanoparticles on lipid vesicles: Insights from LUVs and GUVs. *Journal of Molecular Liquids*, 406, 125081. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.125081>

16. Liu, J., Kaksonen, M., Drubin, D. G., & Oster, G. (2006). Endocytic vesicle scission by lipid phase boundary forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(27), 10277–10282. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601045103>
17. Chookhongkha, N., Sopondilok, T., & Photchanachai, S. (2013). Effect of chitosan and chitosan nanoparticles on fungal growth and chilli seed quality. *Acta Horticulturae*, 973, 231–237. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.973.32>
18. Long, L. T., Tan, L. V., Boi, V. N., & Trung, T. S. (2018). Antifungal activity of water-soluble chitosan against *Colletotrichum capsici* in postharvest chili pepper. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(1), e13339. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13339>
19. Reglinski, T., Elmer, P.A., Taylor, J.T., Wood, P.N., & Hoyte, S.M. (2010). Inhibition of *Botrytis cinerea* growth and suppression of botrytis bunch rot in grapes using chitosan. *Plant Pathology*, 59, 882–890. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02312.x>Digital
20. Wu, K., Yan, Z., Wu, Z., Li, J., Zhong, W., Ding, L., Zhong, T., & Jiang, T. (2024). Recent Advances in the Preparation, Antibacterial Mechanisms, and Applications of Chitosan. *Journal of Functional Biomaterials*, 15(11), 318. <https://doi.org/10.3390/jfb15110318>
21. He, L., Liu, Y., Mustapha, A., & Lin, M. (2011). Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Microbiological research*, 166(3), 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.03.003>
22. El-Batal, A. I., El-Sayyad, G. S., Mosallam, F. M., & El-Sayed, M. A. (2020). *Penicillium chrysogenum*-mediated mycogenic synthesis of copper oxide nanoparticles using gamma rays for in vitro antimicrobial activity against some plant pathogens. *Journal of Cluster Science*, 31(1), 79–90. <https://doi.org/10.1007/s10876-019-01619-3>
23. González-Merino, A. M., Hernández-Juárez, A., Betancourt-Galindo, R., Ochoa-Fuentes, Y. M., Valdez-Aguilar, L. A., & Limón-Corona, M. L. (2021). Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles in *Fusarium oxysporum*–*Solanum lycopersicum* pathosystem under controlled conditions. *Journal of Phytopathology*, 169(7–8), 533–544. <https://doi.org/10.1111/jph.13023>
24. Abdelrhim, A. S., Mazrou, Y. S. A., Nehela, Y., Atallah, O. O., El-Ashmony, R. M., & Dawood, M. F. A. (2021). Silicon Dioxide Nanoparticles Induce Innate Immune Responses and Activate Antioxidant Machinery in Wheat Against *Rhizoctonia solani*. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(12), 2758. <https://doi.org/10.3390/plants10122758>
25. Akpınar Ergün, Ilgin & Sar, Taner & Ünal, Muammer. (2017). Antifungal Effects of Silicon Dioxide Nanoparticles (SiO<sub>2</sub>NPs) against Various Plant Pathogenic Fungi.
26. Sunil, D. (2013). Recent advances on chitosan-metal oxide nanoparticles and their biological application. *Materials Science Forum*, 754, 99–108. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:97560698>
27. Malerba, M., & Cerana, R. (2016). Chitosan Effects on Plant Systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 996. <https://doi.org/10.3390/ijms17070996>
28. Feigl, G. (2023). The impact of copper oxide nanoparticles on plant growth: A comprehensive review. *Journal of Plant Interactions*, 18(1). <https://doi.org/10.1080/17429145.2023.2243098>
29. Gogos, A., Knauer, K., & Bucheli, T. (2012). Nanomaterials in plant protection and fertilization: Current state, foreseen applications, and research priorities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(39), 9781–9792. <https://doi.org/10.1021/jf302154y>
30. Ouda, S. (2014). Antifungal activity of silver and copper nanoparticles on two plant pathogens, *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. *Research Journal of Microbiology*, 9(1), 34–42. <https://scialert.net/abstract/?doi=jm.2014.34.42>
31. Yang, W., Wang, L., Mettenbrink, E. M., DeAngelis, P. L., & Wilhelm, S. (2021). Nanoparticle Toxicology. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 61, 269–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-032320-110338>

32. Krishnaraj, C., Ramachandran, R., Mohan, K., & Kalaichelvan, P. T. (2012). Optimization for rapid synthesis of silver nanoparticles and its effect on phytopathogenic fungi. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 93, 95–99. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.03.002>
33. Kasprowicz, M., Kozió, M., & Gorczyca, A. (2010). The effect of silver nanoparticles on phytopathogenic spores of *Fusarium culmorum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(3), 247–253. <https://doi.org/10.1139/w10-012>
34. Toodehzaeim, M. H., Zandi, H., Meshkani, H., & Hosseinzadeh Firouzabadi, A. (2018). The Effect of CuO Nanoparticles on Antimicrobial Effects and Shear Bond Strength of Orthodontic Adhesives. *Journal of dentistry (Shiraz, Iran)*, 19(1), 1–5.
35. Rizvi, S. A. A., & Saleh, A. M. (2018). Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi pharmaceutical journal: SPJ: the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 26(1), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.10.012>
36. Kasemets, K., Käosaar, S., Vija, H., Fascio, U., & Mantecca, P. (2019). Toxicity of differently sized and charged silver nanoparticles to yeast *Saccharomyces cerevisiae* BY4741: a nano-biointeraction perspective. *Nanotoxicology*, 13(8), 1041–1059. <https://doi.org/10.1080/17435390.2019.1621401>
37. Matras, E., Gorczyca, A., Przemieniecki, S. W., & Oówieja, M. (2022). Surface properties-dependent antifungal activity of silver nanoparticles. *Scientific reports*, 12(1), 18046. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22659-2>
38. Lipke, P. N., & Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of bacteriology*, 180(15), 3735–3740. <https://doi.org/10.1128/JB.180.15.3735-3740.1998>
39. Chen, L.-C., Kung, S.-K., Chen, H.-H., & Lin, S.-B. (2010). Evaluation of zeta potential difference as an indicator for antibacterial strength of low molecular weight chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 913–919. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.06.017>
40. Lopez-Moya, F., Colom-Valiente, M. F., Martínez-Peinado, P., Martínez-Lopez, J. E., Puelles, E., Sempere-Ortells, J. M., & Lopez-Llorca, L. V. (2015). Carbon and nitrogen limitation increase chitosan antifungal activity in *Neurospora crassa* and fungal human pathogens. *Fungal biology*, 119(2-3), 154–169. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.12.003>
41. Jaime, M. D., Lopez-Llorca, L. V., Conesa, A., Lee, A. Y., Proctor, M., Heisler, L. E., Gebbia, M., Giaefer, G., Westwood, J. T., & Nislow, C. (2012). Identification of yeast genes that confer resistance to chitosan oligosaccharide (COS) using chemogenomics. *BMC genomics*, 13, 267. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-267>
42. Kim, E., Kang, M., Liu, H., Cao, C., Liu, C., Bentley, W. E., Qu, X., & Payne, G. F. (2019). Pro- and Anti-oxidant Properties of Redox-Active Catechol-Chitosan Films. *Frontiers in chemistry*, 7, 541. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00541>
43. López-Moya, F., Kowbel, D., Nueda, M. J., Palma-Guerrero, J., Glass, N. L., & Lopez-Llorca, L. V. (2016). *Neurospora crassa* transcriptomics reveals oxidative stress and plasma membrane homeostasis biology genes as key targets in response to chitosan. *Molecular bioSystems*, 12(2), 391–403. <https://doi.org/10.1039/c5mb00649j>
44. Roller, S., & Covill, N. (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International journal of food microbiology*, 47(1-2), 67–77. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(99\)00006-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(99)00006-9)
45. Kessler, A., Hedberg, J., Blomberg, E., & Odnevall, I. (2022). Reactive Oxygen Species Formed by Metal and Metal Oxide Nanoparticles in Physiological Media—A Review of Reactions of Importance to Nanotoxicity and Proposal for Categorization. *Nanomaterials*, 12(11), 1922. <https://doi.org/10.3390/nano12111922>
46. Lakshmi Prasanna, V., & Vijayaraghavan, R. (2015). Insight into the Mechanism of Antibacterial Activity of ZnO: Surface Defects Mediated Reactive Oxygen Species Even in the Dark. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, 31(33), 9155–9162. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b02266>

47. Attarilar, S., Yang, J., Ebrahimi, M., Wang, Q., Liu, J., Tang, Y., & Yang, J. (2020). The Toxicity Phenomenon and the Related Occurrence in Metal and Metal Oxide Nanoparticles: A Brief Review From the Biomedical Perspective. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 822. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00822>
48. Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1–26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
49. Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
50. Repetto, M., Semprine, J., & Boveris, A. (2012). Lipid peroxidation: Chemical mechanism, biological implications and analytical determination. In *Lipid peroxidation*. InTech. <https://doi.org/10.5772/45943>
51. Akagawa, M. (2021). Protein carbonylation: Molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches. *Free Radical Research*, 55(4), 307–320. <https://doi.org/10.1080/10715762.2020.1851027>
52. Fedorova, M., Bollineni, R., & Hoffmann, R. (2014). Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies. *Mass Spectrometry Reviews*, 33(2), 79–97. <https://doi.org/10.1002/mas.21381>
53. Gilbert, J. L. (2017). Corrosion in the human body: Metallic implants in the complex body environment. *Corrosion*, 73(12), 1478–1495. <https://doi.org/10.5006/2563>
54. Dominguez, G. A., Lohse, S. E., Torelli, M. D., Murphy, C. J., Hamers, R. J., Orr, G., & Klaper, R. D. (2015). Effects of charge and surface ligand properties of nanoparticles on oxidative stress and gene expression within the gut of *Daphnia magna*. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 162, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.02.015>
55. Sant, D. G., Tupe, S. G., Ramana, C. V., & Deshpande, M. V. (2016). Fungal cell membrane-promising drug target for antifungal therapy. *Journal of applied microbiology*, 121(6), 1498–1510. <https://doi.org/10.1111/jam.13301>
56. Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., & Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state-of-the-art review. *International journal of food microbiology*, 144(1), 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>
57. Ing, L. Y., Zin, N. M., Sarwar, A., & Katas, H. (2012). Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *International journal of biomaterials*, 2012, 632698. <https://doi.org/10.1155/2012/632698>
58. Zakrzewska, A., Boorsma, A., Brul, S., Hellingwerf, K. J., & Klis, F. M. (2005). Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to the plasma membrane-perturbing compound chitosan. *Eukaryotic cell*, 4(4), 703–715. <https://doi.org/10.1128/EC.4.4.703-715.2005>
59. Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M., & Chapeland, F. (2002). Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest management science*, 58(9), 876–888. <https://doi.org/10.1002/ps.566>
60. Walker, L. A., Gow, N. A., & Munro, C. A. (2010). Fungal echinocandin resistance. *Fungal genetics and biology: FG & B*, 47(2), 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.09.003>
61. Lima, S. L., Colombo, A. L., & de Almeida Junior, J. N. (2019). Fungal Cell Wall: Emerging Antifungals and Drug Resistance. *Frontiers in microbiology*, 10, 2573. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02573>
62. Song, L., Wang, S., Zou, H., Yi, X., Jia, S., Li, R., & Song, J. (2025). Regulation of ergosterol biosynthesis in pathogenic fungi: Opportunities for therapeutic development. *Microorganisms*, 13(4), 862. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13040862>

## БЛАГОДАРНОСТИ

На първо място искам да изкажа дълбоката си признателност към моите научни ръководители. Благодаря на проф. д-р Галя Станева за безценните съвети, задълбочените знания и придобитите практически умения в областта на липидологията, биофизиката и моделните мембрани. Изразявам своята признателност към доц. д-р Анелия Костадинова за предоставената възможност да работя по тази тема, за ценните знания и опит в областта на нанотехнологиите и молекулярната биология. Искрено ви благодаря за неотлъчната подкрепа, доверието и създадената среда за развитие и научно израстване.

Изказвам и специални благодарности към съавторите, допринесли за реализирането на настоящата дисертация и съпътстващите я научни публикации. Благодаря на доц. д-р Екатерина Крумова и нейния колектив от Института по микробиология „Стефан Ангелов“ към БАН за професионализма, отвореността към дискусии и ползотворното сътрудничество. Благодаря също на д-р Хишам Елиоки и неговия колектив от Централна лаборатория по нанотехнологии и съвременни материали, Център за селскостопански изследвания, Гиза, Египет за високия професионализъм и отдадеността към съвместната ни работа.

Благодаря също на секция “Липид-белтъчни взаимодействия” със завеждащ секция проф. д-р Галя Станева за това, че ми беше осигурена възможността да използвам наличната апаратура в секцията и да придобия теоретични и практически умения. Искам да изразя и лични благодарности към гл. ас. д-р Весела Йорданова за колегиалното отношение и готовността за споделяне на знания и опит още в момента на постъпването ми в академията.

Благодаря и на моите близки колеги в академията за страхотната работна и приятелска атмосфера и ползотворните научни дискусии. Не на последно място, изказвам дълбоката си благодарност към моето семейство и приятели за разбирането и подкрепата на моята научна амбиция през целия период на дисертационната ми работа.

Изказвам благодарности към следните проекти за финансово обезпечаване на проведената експериментална работа, научни публикации и участието в научни форуми по темата на дисертацията:

- (1) Двустранно международно сътрудничество между Института по биофизика и биомедицинско инженерство към БАН и Technology (ASRT) and Nanotechnology and Advanced Materials Central Lab, Agricultural Research Centre, Egypt на тема “Biological activity of nanocomposites materials with potential 71 medical and microbiology application” – консумативи и публикации
- (2) Д01-183/2022 „Национален център по биомедицинска фотоника“, част от Националната пътна карта за научна инфраструктура 2020 – 2027 – апаратура

*(3) КП-06-Н77/13 Изследване на двигателната и физиологичната активност чрез биосъвместими и антибактериални мултимодални сензори 2023 – 2027 – конференции и публикации.*

*Изказвам и благодарности към Министерството на образованието и науката Национална изследователска програма „Млади учени и постдокторанти - 2“, Модул „Млади учени“, за финансовата подкрепа по проекта „Биологична активност на наноматериали на базата на хитозан с потенциални биомедицински и агробиологични приложения“.*