



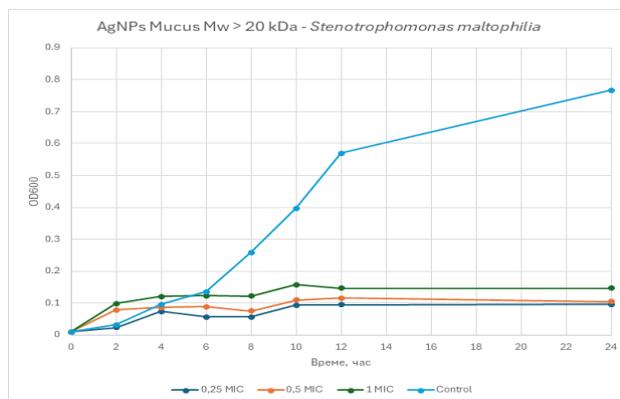
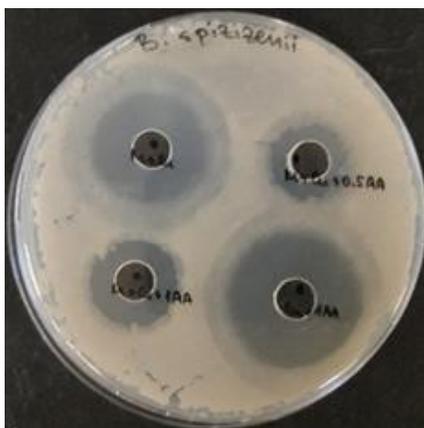
ОТЧЕТ

за изпълнение на заложените изследвания през ЕТАП 1 по проект:
„Разработване на нови биологични наночастици от слюзта на градински охлюв
Cornu aspersum като антимицробни агенти“

Договор № КП-06-Н61/8 от 15.12.2022 г.

от партньорска организация: *Софийски университет „Св. Климент
Охридски“, Биологически факултет*

ръководител: доц. д-р Венцислава Петрова



РАБОТЕН ПАКЕТ 4: ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АНТИМИКРОБНИЯ КАПАЦИТЕТ НА ПОЛУЧЕНИТЕ НАНОПРЕПАРАТИ

Антимикробната резистентност се превръща в една от водещите заплахи за човешкото здраве и начин на живот днес. Според оценките на Световната здравна организация (СЗО), антимикробната резистентност може да бъде причина за около 10 милиона смъртни случая годишно до 2050 г. и ще надхвърли броя на смъртните случаи от рак. Подобна ситуация налага търсенето на нови алтернативи срещу бактериалните инфекции (GLASS Report, WHO, 2022). Металите са познати отдавна с антимикробните си качества. Те имат широкоспектърно антибактериално действие, което ги прави добри алтернативни антибактериални агенти. Развитие на нанотехнологиите, особено получаването на метални наночастиците (НЧ-ци), които могат да бъдат проектирани с комбинация от желани свойства, привлякоха голям интерес особено като антимикробни агенти за борба с MDR (мултирезистентните щамове) и AMR (антимикробно резистентни щамове) патогенни щамове.

От друга страна, мукусът от градински охлюв *Cornu aspersum* съдържа разнообразни пептиди, протеини и гликопротеини, част от които имат доказано антибактериално действие (Pitt et al., 2015; Dolashki et al., 2020). Освен това мукусът може да се използва и като редуциращ агент в зеления синтез на метални и метално-оксидни наночастици (Mane et al., 2021; Di Filippo et al., 2022). Получените наночастици образуват с мукуса органично-метален комплекс – материал, чиито съставни части имат синергично антибактериално действие.

Във връзка с това **основна цел на Работен пакет 4 Определяне на антимикробния капацитет на получените нанопрепарати** бе да се изследва антимикробния капацитет на синтезираните Ag, CuO и ZnO-БНЧ-ци и тяхната ефективност спрямо различни патогенни бактериални и гъбни щамове. За целта бяха използвани одобрени международни процедури за определяне на антимикробен ефект и за установяване на MIC, MBC и MFC.

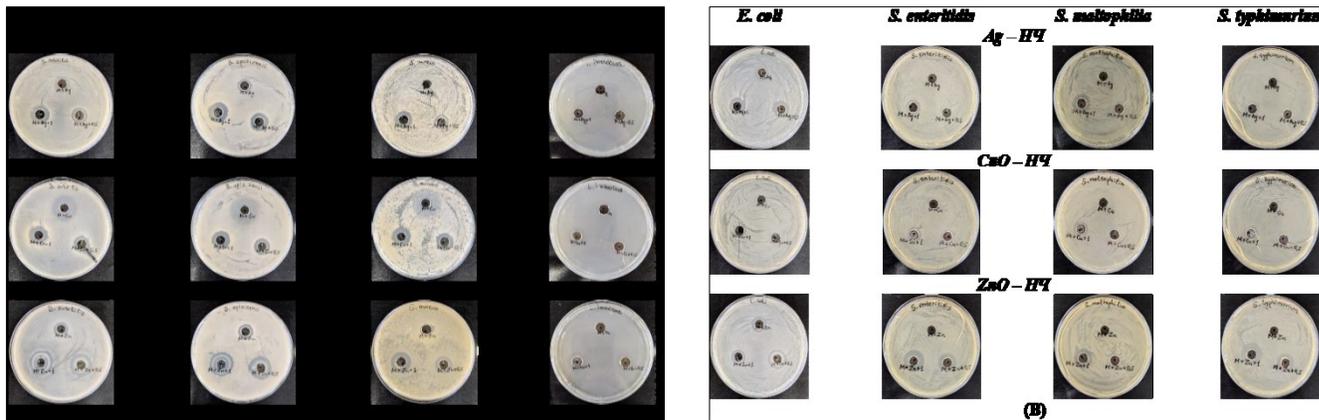
Дейност 4.1: Характеризиране на антибактериалната активност на изследваните наночастици

При изпълнението на Дейност 4.1 бяха изследвани антибактериалните свойства на нанопрепарати (Ag-НЧ, ZnO-НЧ и CuO-НЧ), синтезирани в два варианта – с редуциращ мукус с фракция с молекулна маса $M_w < 20$ kDa и фракция с $M_w > 20$ kDa. Допълнително бяха анализирани и варианти на Ag-НЧ, ZnO-НЧ и CuO-НЧ-ци, синтезирани с участието на аскорбинова киселина (AA), като втори редуциращ агент в концентрации 0.5 и 1.0 M. Ефективността на нанопрепаратите беше изследвана посредством дифузионен метод в агар спрямо осем експериментални бактериални щамове: четири Грам-положителни (*Bacillus subtilis* NBIMCC 2353; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Listeria innocua* NBIMCC 8755; *Bacillus spizizenii* ATCC 6633) и четири Грам-отрицателни (*Escherichia coli* ATCC 8739; *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 17666; *Salmonella typhimurium* NBIMCC 8691; *Salmonella enteritidis* NBIMCC 8691) бактерии.

4.1.1. Определяне на антибактериалните свойства на получените БНЧ-ци посредством дифузионен метод в агара

A) Антибактериален ефект при наночастици с фракция на мукус с $M_w < 20$ kDa

Чувствителността на експерименталните щамове към НЧ-ци с мукус с $M_w < 20$ kDa беше анализирана чрез измерване на диаметъра на зоната на инхибиране, след дифузия на НЧ-ците в агара и култивиране на тест-микроорганизмите при оптимални за растежа им параметри. Резултатите от метода на дифузия в агар представени на Фиг. 1. В Таблица 1 са отразени стойностите, след измерване на зоните на инхибиране на растежа при изследваните щамове бактерии. Стойностите за пробите с мукус с $M_w < 20$ kDa и НЧ-ците са представени графично на Фиг. 2

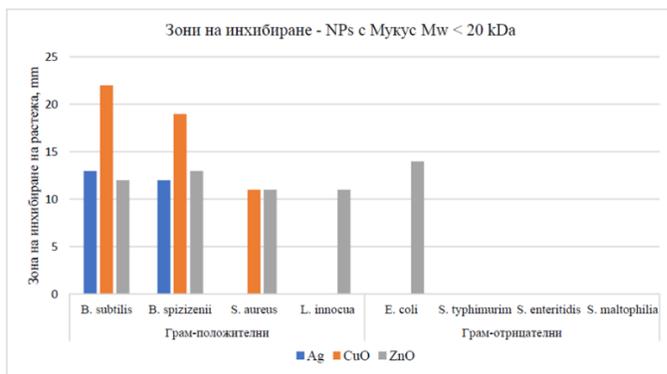


Фигура 1: Изследване на антибактериалната активност на Ag, CuO и ZnO НЧ-ци, синтезирани с мукус Mw < 20 kDa срещу (А) Грам + тест микроорганизми и (В) Грам – тест микроорганизми

Проведените изследвания показват, че НЧ-ците, синтезирани с мукус с Mw < 20 kDa проявяват значително по-силно действие върху Грам-положителните тест щамовете. Единственият Грам-отрицателен щам, който проявява чувствителност, е *E. coli* към ZnO-НЧ – зона на инхибиране на растежа – 14 mm. Двата най-чувствителни Грам-положителни щама са *B. subtilis* NBIMCC 2353 (зони на инхибиране при въздействие със Ag, CuO и ZnO съответно 13, 22 и 16 mm) и *B. spizizenii* ATCC 6633 (инхибиторни зони при Ag, CuO и ZnO съответно 12, 19 и 13 mm), като прави впечатление значителното антибактериално действие на CuO-НЧ, с инхибиторни зони съответно 22 и 19 mm. Това вероятно се дължи на наличието на много аминни и карбоксилни групи в клетъчната стена на видовете от р. *Bacillus*, като тези функционални групи могат да се свързват с CuO-НЧ което повишава чувствителността на видовете към тези препарати (Beyth et al., 2015, Giannousi et al., 2017). Най-резистентен е *L. innocua*, който проявява чувствителност само към ZnO-НЧ (d=11 mm).

Таблица 1. Зони на инхибиране на растежа при НЧ-ци с мукус от *C. aspersum* с Mw < 20 kDa

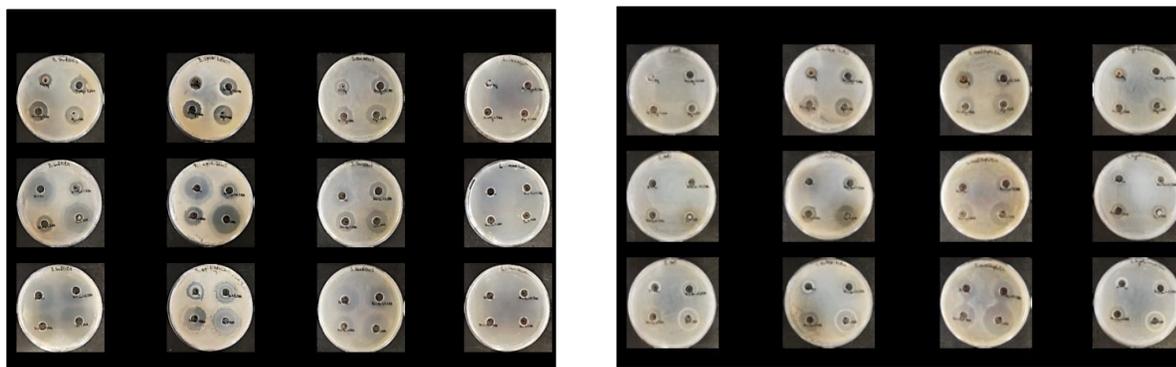
Зона на инхибиране на растежа (D, mm)								
Проба	Грам-положителни щамовете				Грам-отрицателни щамовете			
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. spizizenii</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurim</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. maltophilia</i>
Mucus + Ag	13	12	0	0	0	0	0	0
Mucus + Ag + 0.5M AA	14	15	12	0	15	0	0	0
Mucus + Ag + 1M AA	16	16	14	0	15	0	0	16
Mucus + Cu	22	19	11	0	0	0	0	0
Mucus + Cu + 0.5M AA	14	13	15	0	0	0	0	0
Mucus + Cu + 1M AA	16	15	16	0	0	0	0	13
Mucus + Zn	12	13	11	11	14	0	0	0
Mucus + Zn + 0.5M AA	20	19	15	14	17	14	16	0
Mucus + Zn + 1M AA	22	20	17	15	17	19	18	17



Фигура 2. Сравнителен анализ на зоните на инхибиране на растежа – НЧ-ци, синтезирани с мукус с Mw < 20 kDa

Б) Антибактериален ефект при наночастици с фракция на мукус с Mw > 20 kDa

Резултатите от изследванията на антибактериалната активност на проби НЧ-ци, получени с фракция на мукус от градински охлюв *C. aspersum* с Mw > 20 kDa са представени на Фиг. 3 и са обобщени в Таблица 2 и Фиг. 4.

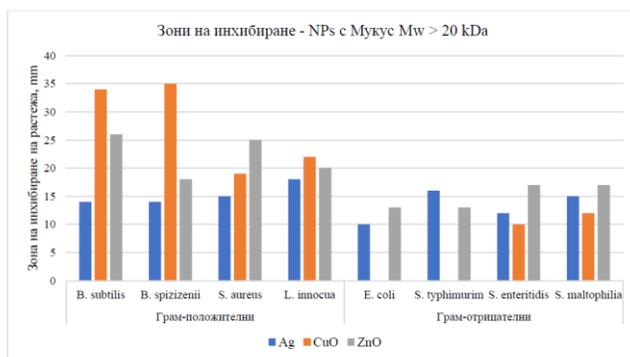


Фигура 3.: Изследване на антибактериалната активност на Ag, CuO и ZnO НЧ-ци, синтезирани с мукус Mw > 20 kDa срещу (А) Грам + тест микроорганизми и (В) Грам – тест микроорганизми

Анализът на получените данни показва значително по-добрата антибактериална активност на НЧ-ци получени с мукус с Mw > 20 kDa върху всички експериментални щамове в сравнение с тези с мукус с Mw < 20 kDa. Отново CuO-НЧ-ци притежаваха силен ефект върху *B. subtilis* (d=34 mm) и *B. spizizenii* (d=34 mm). Силно действие бе отчетено и за ZnO-НЧ върху *B. subtilis* (d=26 mm) и *S. aureus* (d=25 mm). Докато НЧ-ци с мукус с Mw < 20 kDa почти нямаха ефект върху Грам-отрицателните щамове, НЧ-ците с мукус Mw > 20 kDa потискаха растежа на почти всички изследвани от нас бактериални щамове. От данните в Таблица 2 и Фиг. 4 е видно че при всички шест варианта на наночастиците, антибактериалното действие срещу Грам-положителните щамове е по-силно изразено от това върху Грам-отрицателните.

Таблица 2. Зони на инхибиране на растежа при НЧ-ци с мукус от *C. aspersum* с Mw > 20 kDa

Зона на инхибиране на растежа (D, mm)								
Проба	Грам-положителни щамове				Грам-отрицателни щамове			
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. spizizenii</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurim</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. maltophilia</i>
Mucus + Ag	14	14	15	18	10	16	12	15
Mucus + Ag + 0.5M AA	17	18	18	24	13	0	16	14
Mucus + Ag + 1M AA	19	19	18	28	13	0	18	16
Ag + 1M AA	18	20	20	32	16	16	18	20
Mucus + Cu	34	35	19	22	0	0	10	12
Mucus + Cu + 0.5M AA	16	22	18	25	11	12	14	18
Mucus + Cu + 1M AA	19	18	20	23	14	15	16	21
Cu + 1M AA	35	38	21	30	18	16	19	23
Mucus + Zn	26	18	25	20	13	13	17	17
Mucus + Zn + 0.5M AA	24	22	24	26	15	16	16	18
Mucus + Zn + 1M AA	25	24	19	28	18	16	18	21
Zn + 1M AA	28	27	25	30	21	19	20	30

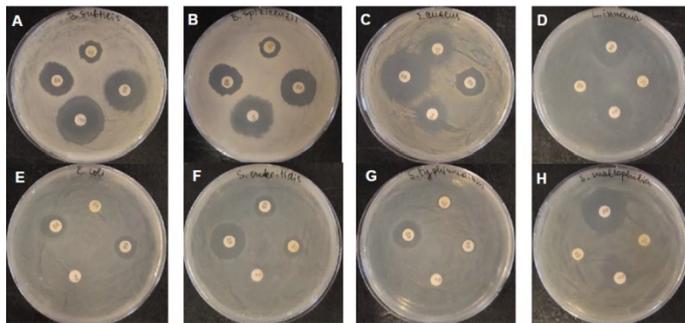


Фигура 4. Сравнителен анализ на зоните на инхибиране на растежа – НЧ-ци, синтезирани с мукус с Mw > 20 kDa

Много изследвания съобщават за по-силна антибактериална активност на метални НЧ-ци към Грам-положителните бактерии (Correa et al., 2020, Gabrielyan and Trchounian, 2019). Това наблюдение се потвърждава от резултатите на Азам и кол., които съобщават, че ZnO-НЧ и CuO-НЧ проявяват съответно 16-24% и 28-33% по-силна антибактериална активност към Грам-положителни щамове (*B. subtilis* и *S. aureus*), отколкото към Грам-отрицателни (*E. coli* и *P. aeruginosa*) при прилагане на дифузионния метод в агар (Azam et al., 2012). Добавянето на аскорбинова киселина (AA) при синтеза на наночастиците усилва антибактериалните им свойства. Това вероятно се дължи на редуциращите свойства на AA, което води до образуването на наночастици с по-добри свойства. Това е доказано и от Мане и кол., които синтезират сребърни наночастици със слуз от охлюв и добавена аскорбинова киселина, като получените Ag-НЧ показват по-добри антибактериални свойства (Mane et al., 2021).

В) Сравнителен анализ на антибактериалния ефект на получените НЧ-ци с конвенционални антибиотици

Чувствителността на осемте експериментални бактериални щама към често използвани в медицинската практика антибиотични препарати - ванкомицин (VA), амоксилав (АМС), еритромицин (Е) и цефалексин (СН) беше изследвана посредством класическия дисково-дифузионния метод. Получените резултати са представени на Фиг. 5 и Таблица 3.



Фигура 5. Дисково-дифузионния тест за чувствителност към антибиотици на експериментални щамове – *B. subtilis* (A), *B. spizizenii* (B), *S. aureus* (C), *L. innocua* (D), *E. coli* (E), *S. enteritidis* (F), *S. typhimurium* (G) и *S. maltophilia* (H). Антибиотици - ванкомицин (VA), амоксиклав (AMC), еритромицин (E) и цефалексин (CN).

Таблица 3: Дисково-дифузионен тест – зони на инхибиране на растежа. Антибиотици - ванкомицин (VA), амоксиклав (AMC), еритромицин (E) и цефалексин (CN).

Микроорганизми	Зона на инхибиране на растежа (D, mm)			
	VA	AMC	E	CN
Грам-положителни щамове				
<i>Bacillus subtilis</i>	23	13	26	17
<i>Bacillus spizizenii</i>	21	12	24	19
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	17	18	27
<i>Listeria innocua</i>	22	0	20	0
Грам-отрицателни щамове				
<i>Escherichia coli</i>	12	0	0	12
<i>Salmonella typhimurium</i>	10	10	0	16
<i>Salmonella enteritidis</i>	12	12	0	19
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	25	0	14	0

От получените резултати бе видно, че изследваните антибиотици имат по-силен ефект върху Грам-положителните щамове. Най-широкоспектърен е VA, който има антибактериален ефект върху всички осем изследвани щамове. Поради това VA е избран и за положителна контрола при тестване на антибактериалните свойства на наночастиците, включително при определяне на MIC и MBC. Най-чувствителни на VA са *B. subtilis* (23 mm), *L. innocua* (22 mm) и *S. maltophilia* (25 mm). При Грам-отрицателните най-ефективни са VA и CN, като AMC има слаб ефект, а към E е отчетена резистентност при 3/4 от изследваните щамове. Най-резистентен към използваните антибиотици е *E. coli*, при който два антибиотика нямат ефект (AMC и E), а другите два (VA и CN) действат слабо със зона на инхибиране само 12 mm. Получените наночастици показват активност сравнима и дори по-висока от най-активните тествани антибиотици. Най-добър ефект се наблюдава при CuO-НЧ и ZnO-НЧ, синтезирани с фракция от мукус с $M_w > 20$ kD, при които при Грам + тест-микроорганизми се отчита инхибиторен ефект с 10-30% по-висок от този на еритромицина, а срещу Грам -, ефективността е сравнима с тази на ванкомицина. Ag-НЧ, получени със същата фракция ($M_w > 20$ kD), имат активност аналогична на тази на най-активните антибиотици. Отчита се и добри антибактериални свойства към резистентните към антибиотици щамове. Например *L. innocua* и *S. maltophilia* проявяват резистентност към AMC и CN, но са чувствителни към Ag, ZnO и CuO НЧ синтезирани с мукус с $M_w > 20$ kDa. Това показва, че Ag, ZnO и CuO НЧ-ци могат да бъдат потенциален антибактериални агенти, приложими при третиране на резистентни към антибиотици бактериални щамове.

4.1.2. Определяне на MIC и MBC

Минималната инхибираща концентрация (MIC) на изследваните наночастици (Ag, ZnO и CuO-НЧ с мукус с Mw > 20 kDa и Mw < 20 kDa), както и на ванкомицин (VA), за всички тест микроорганизми, беше определяна посредством метода на микроразреджанията в хранителен месопептонен бульон МПБ. За установяване на минималната бактерицидна концентрация (MBC) проби от плаките за микроразреджания бяха култивирани на твърда хранителна среда МПА.

А) Наночастици с фракция мукус Mw < 20 kDa

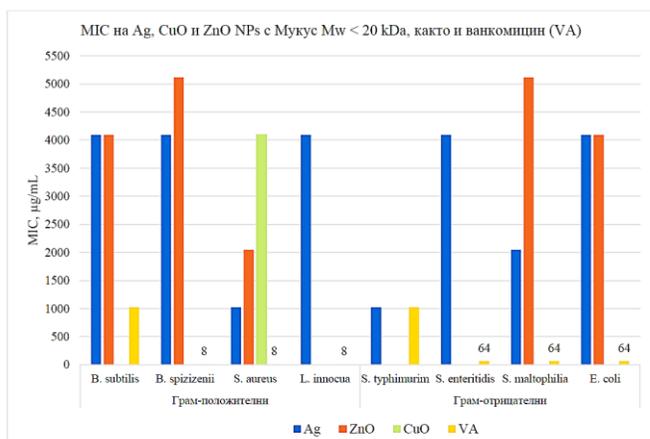
Определянето на MIC и MBC на НЧ-ци с мукус Mw < 20 kDa потвърдиха предходните данни за тяхното слабо антибактериално действие (Таблица 4).

Таблица 4: MIC и MBC на БНЧ-ци, синтезирани с мукус Mw < 20 kDa

БНЧ-ци с мукус Mw < 20 kDa								
Грам + щамове	MIC, µg/ml				MBC, µg/ml			
	Ag	ZnO	CuO	VA	Ag	ZnO	CuO	VA
<i>B. subtilis</i>	4096	4096	-	1024	-	-	-	4096
<i>B. spizizenii</i>	4096	5120	-	8	-	-	-	256
<i>S. aureus</i>	1024	2048	4096	8	5120	-	-	128
<i>L. innocua</i>	4096	-	-	8	-	-	-	-
Грам – щамове								
<i>S. typhimurim</i>	1024	-	-	1024	4096	-	-	-
<i>S. enteritidis</i>	4096	-	-	64	4096	-	-	-
<i>S. maltophilia</i>	2048	5120	-	64	2048	-	-	-
<i>E. coli</i>	4096	4096	-	64	5120	-	-	4096

С някои изключения, стойностите на MIC са много високи, като при CuO-НЧ при 90% от изследваните щамове не са отчетени такива в широк диапазон от концентрации (8 - 5120 µg/mL), а при *S. aureus* стойността на MIC е 4096 µg/mL, което говори за много слаб антибактериален ефект (Таблица 4). Също така при CuO-НЧ и ZnO-НЧ не са отчетени стойности на MBC в изследвания диапазон от концентрации, което определя липса на бактерицидно действие на тези наночастици.

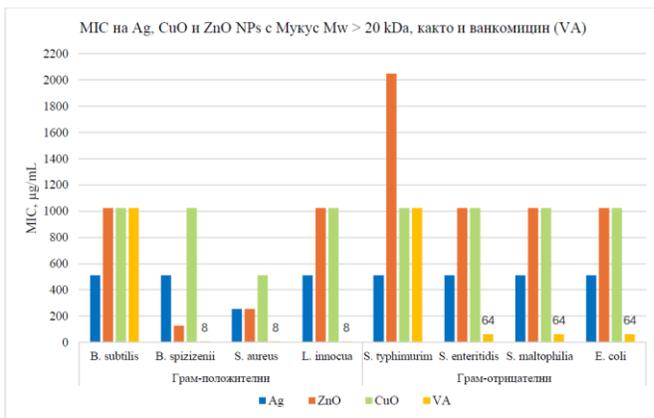
Най-силен антибактериален ефект от изследваните наночастици имат Ag, които показват MIC при всички осем експериментални щама, включително и добро действие срещу *S. aureus* и *S. typhimurium* - MIC = 1024 µg/mL и при двата вида (Фиг. 6). При *S. maltophilia* Ag-НЧ имат MIC = 2048 µg/mL, а при останалите пет щама MIC = 4096 µg/mL. Най-слабо действие имат CuO-НЧ които имат само един отчетен MIC – при *S. aureus* (MIC = 4096 µg/mL). Най-чувствителен към изследваните БНЧ-ци е *S. aureus*. Това е единственият щам, при който е отчетена MIC за CuO-НЧ, както и шамът с най-ниски стойности на MIC за Ag-НЧ (MIC = 1024 µg/mL) и ZnO-НЧ (MIC = 2048 µg/mL). Наночастиците с мукус с Mw < 20 kDa имат значително по-слаб ефект от ванкомицина към изследваните щамове, с изключение на *S. typhimurim*, при който стойностите на MIC за ванкомицина и Ag-НЧ са равни (MIC = 1024 µg/mL) (Фиг. 6).



Фигура 6: Сравнителен анализ на МИС ($\mu\text{g}/\text{mL}$) на НЧ-ци с мукус Mw < 20 kDa и ванкомицин (VA).

Б) Наночастици с фракция мукус Mw > 20 kDa

Следваща стъпка в нашите изследвания бе определяне на МИС и МВС на синтезираните БНЧ-ци с мукус с Mw > 20 kDa. Получените резултатите са представени в Таблица 5. НЧ-ците с мукус с Mw > 20 kDa имат значително по-добър антибактериален ефект от тези с мукус с Mw < 20 kDa. Има отчетени стойности на МИС за всички БНЧ-ци при всички експериментални щамове (Фиг. 7), както и значително по-голям брой отчетени стойности на МВС в сравнение с НЧ-ците с мукус с Mw < 20 kDa. При НЧ-ци с мукус с Mw < 20 kDa няма нито една отчетена стойност на МВС за CuO-НЧ докато при НЧ-ци с мукус с Mw > 20 kDa за CuO-НЧ има отчетени стойности на МВС при 6 от 8 щамове.



Фигура 7: Сравнителен анализ на МИС ($\mu\text{g}/\text{mL}$) на БНЧ-ци с мукус с Mw > 20 kDa и на ванкомицин (VA).

От Фиг. 7 е видно, че Ag, ZnO и CuO НЧ-ци с мукус с Mw > 20 kDa имат широкоспектърно антибактериално действие с добри стойности на МИС при всички експериментални щамове. Най-силен антибактериален ефект имат Ag-НЧ, които при 7 от 8 щамове имат стойност на МИС = 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$, а при *S. aureus* МИС = 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ag-НЧ имат и силен бактерициден ефект, като при 5 от 8 щамове минималната бактерицидна концентрация е равна на минималната инхибираща концентрация. CuO-НЧ също имат добро антибактериално действие, като при 7 от 8 щамове стойностите на МИС = 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$, а при *S. aureus* МИС = 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Установено е, че CuO-НЧ имат също и бактерицидно действие, но то е по-слабо изразено от това на Ag-НЧ. ZnO-НЧ имат предимно бактериостатичен ефект. При 7 от 8 изследвани щамове МИС на ZnO-НЧ с мукус с Mw > 20 kDa, е $\leq 1024 \mu\text{g}/\text{mL}$, като само при *S. typhimurium* МИС = 2048 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Само при 2 от 8 щамове обаче (*S. aureus* и *L. innocua*) се отчита минимална бактерицидна концентрация в диапазона на тестваните концентрации (1024 и 4096 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Прави

впечатление, че *S. aureus*, при който MIC = 256 µg/mL, но MBC = 4096 µg/mL – разлика от 16 пъти. Най-чувствителния към ZnO-НЧ е щам – *B. spizizenii* с отчетена стойност за MIC от само 128 µg/mL, но MBC не се отчита. Тези резултати показват наличие на бактериостатично действие на ZnO-НЧ с мукус с Mw > 20 kDa, дори и при високи концентрации.

Таблица 5: MIC и MBC на БНЧ-ци, синтезирани с мукус Mw > 20 kDa

БНЧ-ци с мукус Mw > 20 kDa								
Грам + щамове	MIC, µg/ml				MBC, µg/ml			
	Ag	ZnO	CuO	VA	Ag	ZnO	CuO	VA
<i>B. subtilis</i>	512	1024	1024	1024	1024	-	-	4096
<i>B. spizizenii</i>	512	128	1024	8	4096	-	-	256
<i>S. aureus</i>	256	256	512	8	256	4096	512	128
<i>L. innocua</i>	512	1024	1024	8	512	1024	1024	-
Грам - щамове								
<i>S. typhimurim</i>	512	2048	1024	1024	2048	-	2048	-
<i>S. enteritidis</i>	512	1024	1024	64	512	-	2048	-
<i>S. maltophilia</i>	512	1024	1024	64	512	-	1024	-
<i>E. coli</i>	512	1024	1024	64	512	-	5120	4096

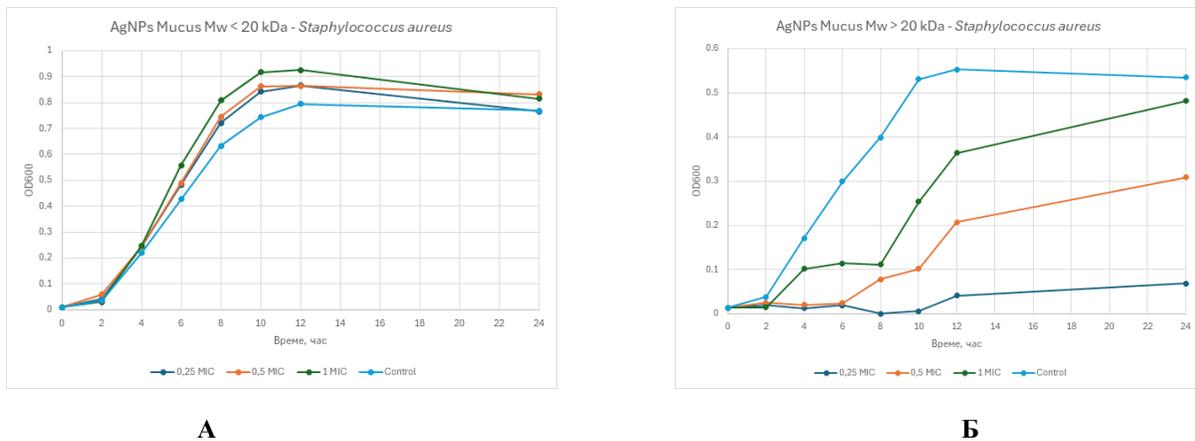
4.1.3. Определяне на антибактериалните свойства на получените БНЧ-ци посредством “Time-Kill” тест

С цел определяне на типа действие (бактерицидно или бактериостатично) на изследваните Ag, CuO и ZnO-БНЧ, както и на зависимостта на клетъчното умиране от концентрацията и времето на въздействие, бе проведен “time-kill” тест. При анализа бяха използвани концентрации, кратни на определената MIC (0.25 MIC, 0.5 MIC и 1 MIC). Като тест-микроорганизми бяха използвани *S. aureus* (представител на Грам-положителните бактерии) и *S. maltophilia* (представител на Грам- бактерии). Резултатите от проведения експеримент са представени като полулогаритмични зависимости.

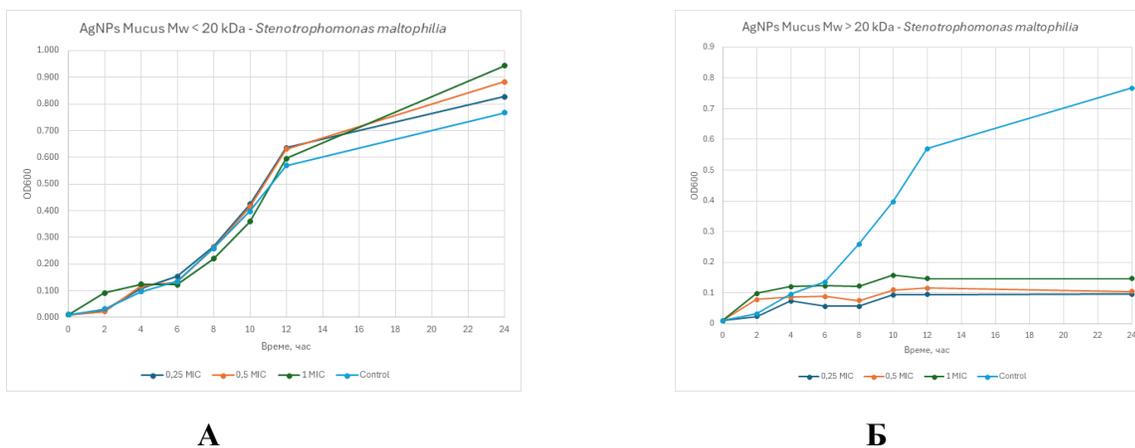
А) Изследване на Ag-БНЧ

Изследването на Ag-НЧ, синтезирани с двете фракции на мукус от градински охлюв *C. aspersum* потвърди, че антибактериалният ефект на тези, получени с редуктор мукус с Mw < 20 kDa е незначителен и не зависи нито от концентрацията на наночастиците, нито от времето им на действие. След 24 часа на култивиране се отчита дори слаб стимулиращ ефект върху микробния растеж както на *S. aureus*, така и на *S. maltophilia* (Фиг. 8А и Фиг. 9А). При растежа на клетките на среда, съдържаща различни концентрации на Ag-НЧ, синтезирани с редуктор мукус с Mw > 20 kDa, се наблюдава изразен антибактериален ефект и при двата тест-микроорганизма. Концентрации на Ag-НЧ от 0.25 и 0.5 MIC действат бактериостатично и забавят бактериалния растеж на *S. aureus*, удължавайки lag фазата в сравнение с контролата. Между 8 и 12 час се наблюдава адаптация на клетките към приложените концентрации на нанопрепарата и в по-ниска степен, но възстановяване на микробния растеж. Концентрация от 1 MIC обаче действат бактерицидно и дори след 24 часа култивиране отчетения бактериален растеж при *S. aureus* е под 10 % от този, установен при нетретираната контрола (Фиг. 8Б).

Антимикробният ефект на Ag-БНЧ, синтезирани с $Mw > 20$ kDa, е още по-добре забележим при Грам-отрицателния бактериален вид *S. maltophilia*, при който всичките тествани концентрации на нанопрепарата имат бактерицидно действие и водят до 100 % инхибиране растежа на тестваната култура (Фиг. 9Б).



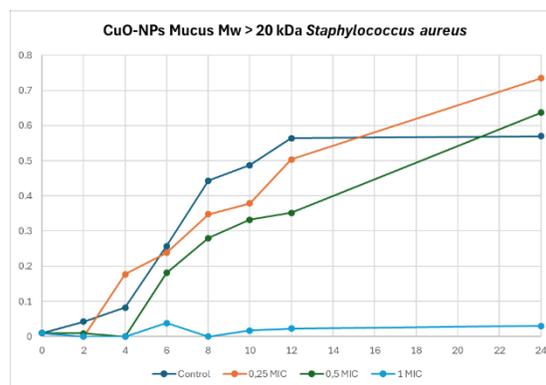
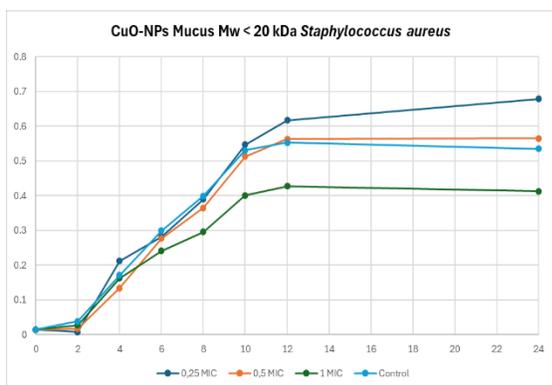
Фигура 8: “Time-Kill” тест след третиране на клетки на *S. aureus* с различни концентрации на Ag-БНЧ, синтезирани с $Mw < 20$ kDa (А) и $Mw > 20$ kDa (Б)



Фигура 9: “Time-Kill” тест след третиране на клетки на *S. maltophilia* с различни концентрации на Ag-БНЧ, синтезирани с $Mw < 20$ kDa (А) и $Mw > 20$ kDa (Б).

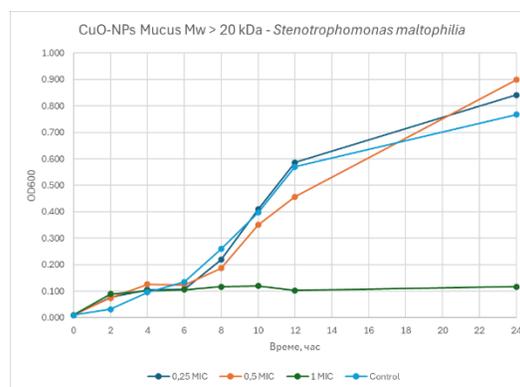
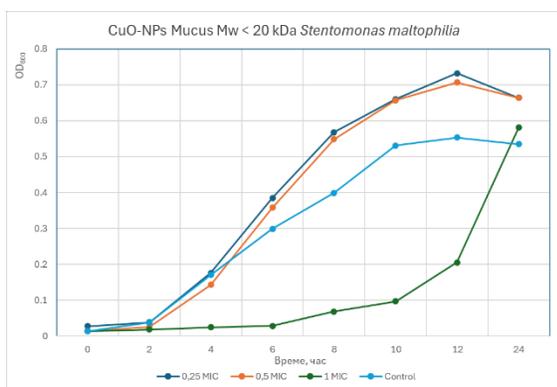
Б) Изследване на CuO-БНЧ

“Time-kill” тест беше проведен и с получените два вариант на CuO-НЧ – с редуктор фракция от мукус на *C. aspersum* с $Mw < 20$ kDa и $Mw > 20$ kDa. При концентрации на CuO-БНЧ с мукус с $Mw < 20$ kDa от 0.25 MIC и 0.5 MIC не беше наблюдавано инхибиране на бактериалния растеж на Грам-положителния тест микроорганизъм *S. aureus* (Фиг. 10А). Добавянето в средата на 1 MIC CuO-НЧ с редуктор мукус с $Mw < 20$ kDa води до 20 % инхибиране на бактериалния растеж. При третиране на клетки *S. aureus* с CuO-БНЧ с мукус с $Mw > 20$ kDa с концентрации от 0.25 MIC и 0.5 MIC добре изразено антибактериално действие също не се наблюдава (Фиг. 10 Б). Прилагането обаче на 1 MIC има бактерициден ефект и микробния растеж се потиска напълно.



Фигура 10: “Time-Kill” тест след третиране на клетки на *S. aureus* с различни концентрации на CuO-БНЧ, синтезирани с Mw < 20 kDa (А) и Mw > 20 kDa (Б)

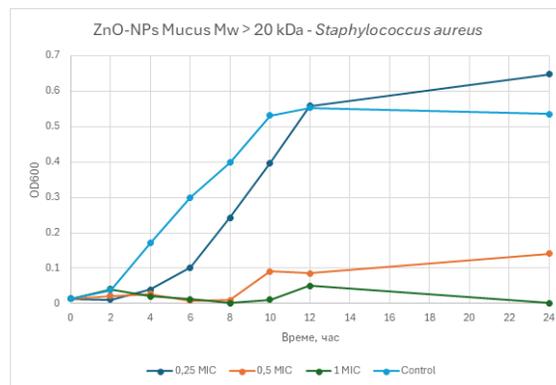
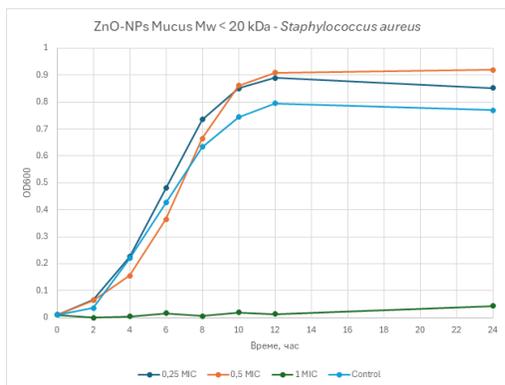
При проследяването на растежа на *S. maltophilia* в присъствието на различни концентрации на CuO-БНЧ, синтезирани с Mw < 20 kDa, се установи, че само при добавянето в средата на концентрация от 1 MIC се наблюдава първоначално бактериостатично действие, което след 12 часа се преустановява и бактериалния растеж се възобновява до нива, сравними с тези на контролата. Същите концентрации, обаче на CuO-БНЧ, синтезирани с Mw > 20 kDa имат отново бактерицидно действие и инхибират на 100% растежа и на Грам-отрицателните тест микроорганизми (Фиг. 11).



Фигура 11: “Time-Kill” тест след третиране на клетки на *S. maltophilia* с различни концентрации на CuO-БНЧ, синтезирани с Mw < 20 kDa (А) и Mw > 20 kDa (Б)

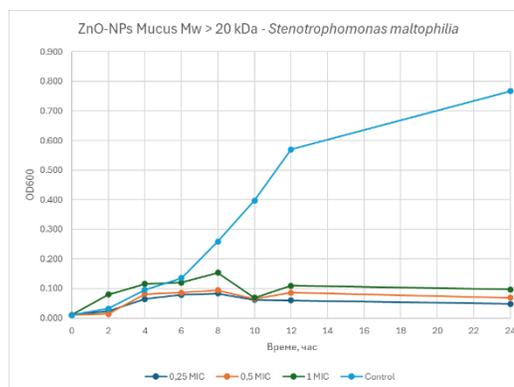
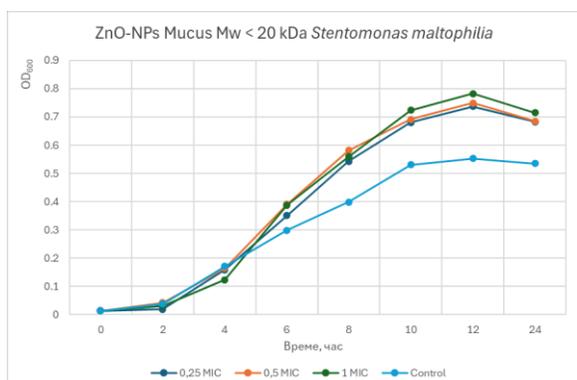
В) Изследване на ZnO-БНЧ

При анализа на антибактериалния ефект на синтезираните ZnO-БНЧ беше установено, че и при двата варианта - редуктор мукус с Mw < 20 kDa и редуктор мукус с Mw > 20 kDa – при концентрация 1 MIC се наблюдава ясен бактерициден ефект върху *S. aureus* (Фиг. 12А и Б). При ZnO-БНЧ с мукус с Mw > 20 kDa 0.5 MIC има силно изразено бактериостатично действие и до 24 час на култивиране успява да инхибира над 70 % от бактериалния растеж.



Фигура 12: “Time-Kill” тест след третиране на клетки на *S. aureus* с различни концентрации на ZnO-БНЧ, синтезирани с Mw < 20 kDa (А) и Mw > 20 kDa (Б)

Нанопрепаратите, получени от нискомолекулната фракция на слюзта от градински охлюв *C. aspersum* не показаха никакъв антибактериален ефект върху *S. maltophilia*, независимо от времето за третиране и приложената концентрация (Фиг.13 А). За разлика от тях, тези, синтезирани с мукус с Mw > 20 kDa и в трите приложени концентрации (0.25, 0.5 и 1 MIC) имаха ясно изразено бактерицидно действие и беше установено 100 % инхибиране на микробния растеж още от самото начало на процеса на култивиране (Фиг. 13Б).

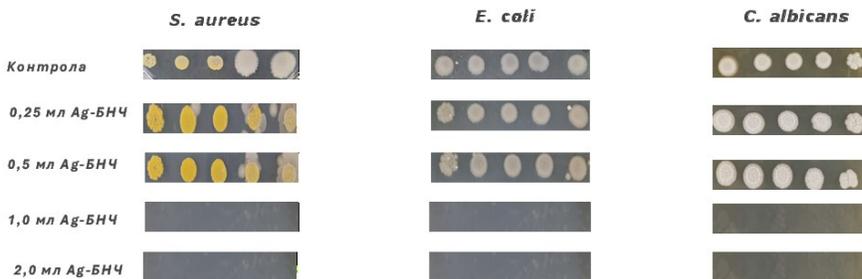


Фигура 13: “Time-Kill” тест след третиране на клетки на *S. maltophilia* с различни концентрации на ZnO-БНЧ, синтезирани с Mw < 20 kDa (А) и Mw > 20 kDa (Б).

4.1.4. Определяне на IC₅₀ на изследваните препарати

Степента на инхибиране на микробния растеж бе проследена с помощта на колониен анализ. За целта бяха използвани 24 часови култури от моделните микробни щамове (*S. aureus*, *E.coli* и *C.albicans*), които бяха култивирани на твърда хранителна среда в присъствието на различни концентрации от синтезираните Ag, ZnO и CuO бионаночастици: 0,25 ml, 0,5 ml, 1,0 ml и 2,0 ml.

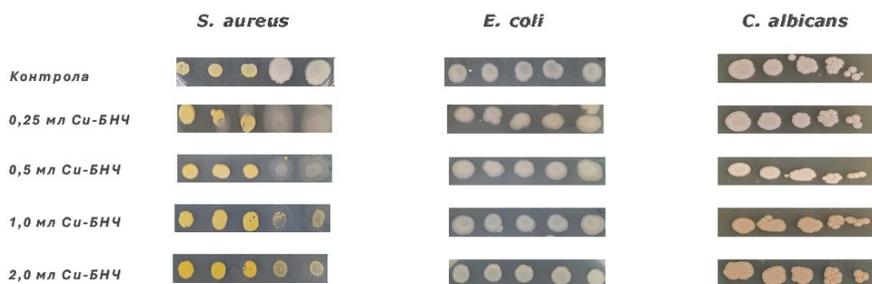
А) Определяне антибактериалната активност и IC_{50} на Ag-бионаночастици



Фигура 14. Антимикробна активност на различни концентрации на Ag БНЧ-ци, получени с редуктор екстракт от слуз на *Cornu aspersum* с Mw > 20 kD

Сребърните наночастици демонстрират мощни антимикробни свойства не само срещу бактерии, но и срещу гъби, в случая срещу дрождевия щам *Candida albicans* – наблюдава се растеж само при добавяне към средата на 0,25 ml и 0,5 ml Ag БНЧ. Въз основа на така проведените експерименти бе определено, че антибактериалната и антигъбната IC_{50} концентрация на синтезираните Ag-бионанопрепарати е 0,02 ml/ml.

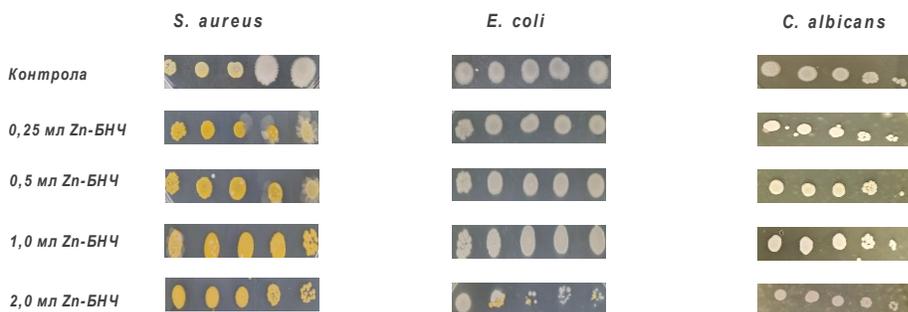
Б) Определяне антибактериалната активност и IC_{50} на CuO-бионаночастици



Фигура 15. Антимикробна активност на различни концентрации на CuO БНЧ-ци, получени с редуктор екстракт от слуз на *Cornu aspersum* с Mw > 20 kD

Получените резултати показват, че както *S. aureus*, така и *E. coli* се характеризират със значително по-ниска чувствителност към CuO-НЧ. Тук за разлика от Ag-БНЧ, се наблюдава растеж и при добавяне към средата на 1,0 ml и 2,0 ml CuO-БНЧ. Изследванията показват, че така приложените концентрации от CuO-наночастиците не са особено ефективни и срещу гъбни микроорганизми, включително патогенни видове като *C. albicans*. В резултат на проведените изследвания може да се предположи, че IC_{50} концентрация на синтезираните CuO бионанопрепарати е по-висока от 0,08 ml/ml.

В) Определяне антибактериалната активност и IC_{50} на ZnO-бионаночастици



Фигура 16. Антимикробна активност на различни концентрации на ZnO бионаночастици, получени с редуктор екстракт от слуз на *Cornu aspersum* с Mw > 20 kD

Получените резултати показват, че добавянето към средата на ZnO-БНЧ-ци в концентрации 0,25 ml, 0,5 ml, 1,0 ml и 2,0 ml, не повлиява значително растежа на представителите на Грам-положителните бактерии *S. aureus*. По-добре изразена антибактериална активност беше наблюдавана срещу Грам-отрицателни бактерии (*E. coli*), където излагането на клетките на 2 ml ZnO-БНЧ води до частично инхибиране на микробния растеж. Това вероятно се дължи на факта, че цинковите наночастици могат да се адсорбират специфично на повърхността на външната им клетъчна мембрана и това да доведе до различни повреди. Важно е да се отбележи, че ZnO-БНЧ-ци, макар и по-слабо от Ag-БНЧ, също притежават известна противогъбна активност, която често варира в зависимост от размера на частиците и тяхната концентрация. При нетретирани проби или при такива, третирани с ниски концентрации като 0,25 ml и 0,5 ml ZnO-БНЧ, можем да наблюдаваме значителен растеж. При концентрации от порядъка на 1,0 ml и 2,0 ml ZnO-БНЧ, обаче се наблюдава частично потискане на този растеж. Получените резултати показват, че IC₅₀ концентрация на синтезираните ZnO-бионанопрепарати, подобно на CuO, е по-висока от 0,08 ml/ml.

Дейност 4.2: Характеризиране на антигъбната активност на изследваните наночастици

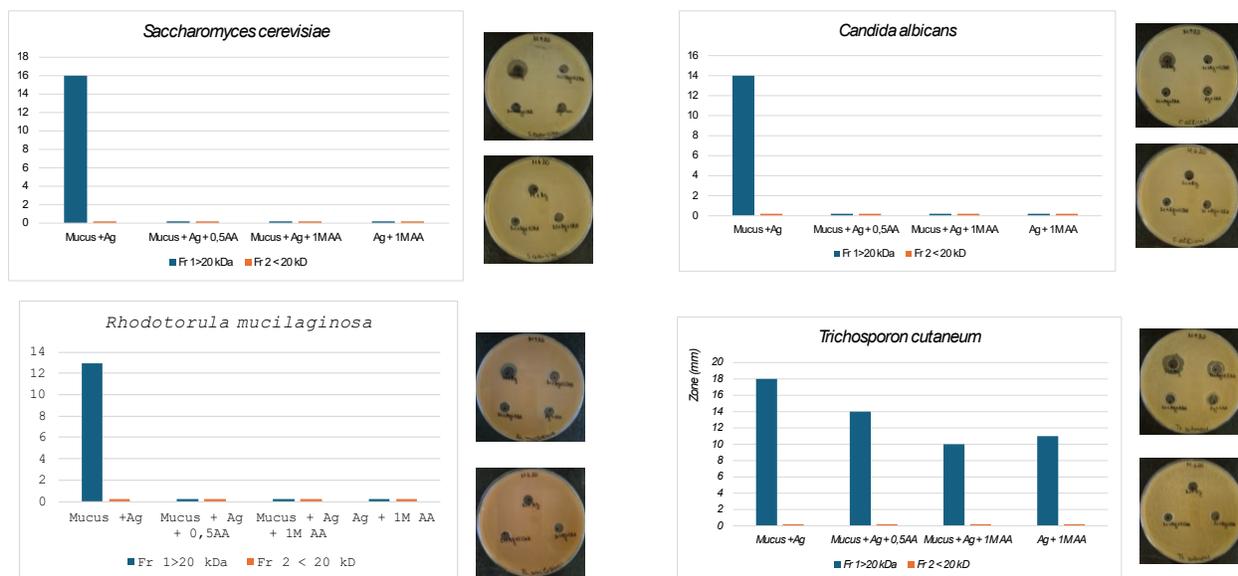
Гъбните инфекции са едни от най-трудните за лечение при хората. Сред най-честите причинители на дрождеви мукози са *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Hansenula anomala*, *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae* и др. (Hazen, 1995; Munro and Teixeira, 2022). Разработването на антигъбни препарати на базата на метални наночастици и мукус от градински охлюв би имало не само доказан фунгициден ефект, но и оздравителен ефект върху пациентите.

4.2.1. Антигъбен ефект на метални наночастици, получени с различни фракции на мукус от градински охлюв *Cornu asperum* и/или аскорбинова киселина

Цел на изследването бе определяне на антигъбния потенциал на метални наночастици (НЧ) в комбинация с мукус (М) от градински охлюв *Cornu asperum* и допълнителен редуктор аскорбинова киселина (АА). Бяха използвани следните тестови дрождеви видове: *Saccharomyces cerevisiae* NBIMCC 584; *Candida albicans* ATCC 14053; *Rhodotorula mucilaginosa* NBIMCC 8676; *Trichosporon cutaneum* NBIMCC 3361.

А) Антигъбен ефект на Ag – наночастици

С цел определяне на антигъбния потенциал на Ag-наночастици, получени с фракции мукус от охлюв *Cornu asperum* и/или аскорбинова киселина бе проведен експеримент чрез метода на ямките в агара и получените резултати са представени на Фиг.17.

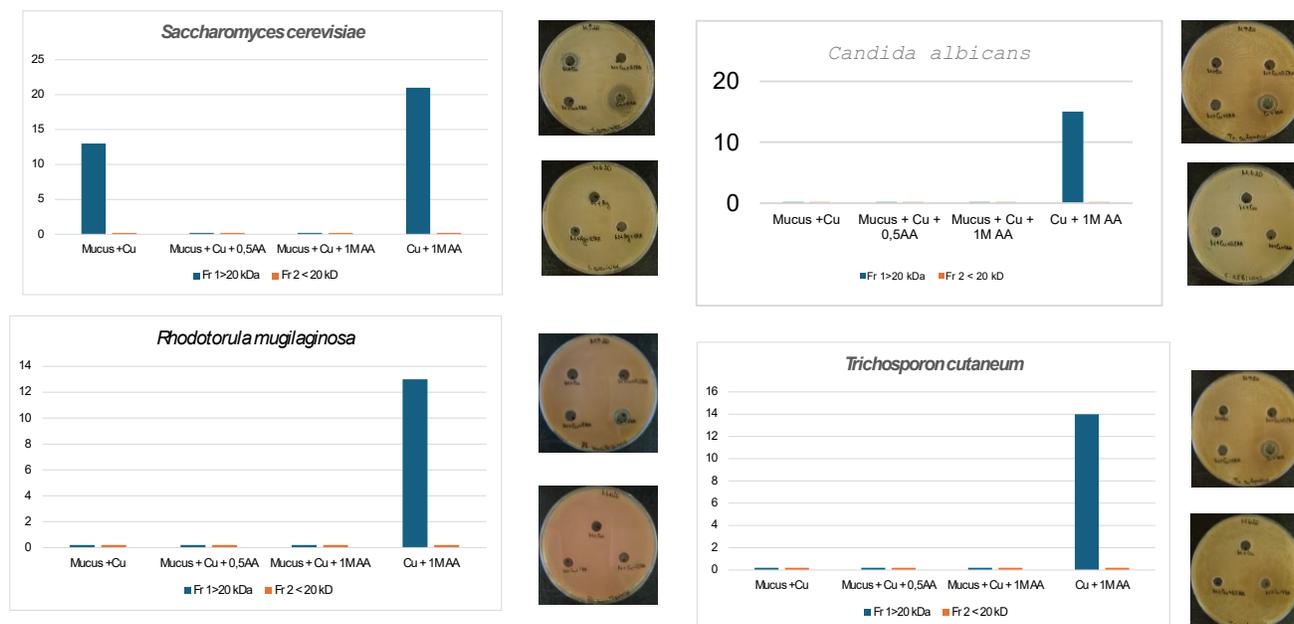


Фигура 17. Зони на инхибиране на растежа на *S.cerevisiae*, *C. albicans*, *R. mucilaginosa*, *T. cutaneum* при използване на Ag-наночастици в комбинации с фракции от мукус и/или аскорбинова киселина.

Анализът на получените резултати показва, че Ag-наночастици в комбинация с фракция мукус под 20 kDa не проявяват антигъбни свойства ($M_w < 20\text{kDa}$) към нито един от изследваните от нас дрождеви микроорганизми. Антигъбен ефект е установен само при проби, съдържащи Ag-наночастици и синтезирани с мукус над 20 kDa ($M_w > 20\text{kDa}$). При три от изследваните дрождеви вида, *S. cerevisiae*, *C. albicans* и *Rh. mucilaginosa* беше отчетен ефект само при пробите с наночастици и мукус, като зоните на инхибиране на растежа са с близки стойности (между 13 и 16 mm). Единствено при *T. cutaneum* са отчетени по-големи зони на инхибиране от пробата със Ag-наночастици и мукус (над 20 kDa) – 18mm. При този дрождеви вид бяха установени и зони на инхибиране на растежа и от другите изследвани проби на варианти на наночастици, а именно наночастици с мукус и с аскорбинова киселина и наночастици само с аскорбинова киселина (между 10 и 14 mm).

Б) Антигъбен ефект на CuO – наночастици

През последните години редица автори докладват за антигъбни свойства на CuO-наночастици и Cu-съдържащи нанокompозити срещу патогенни шамове на *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rh. mucilaginosa* и др. (Rong-Mullins et al., 2017; Garcia-Marin et al., 2022; Saied et al., 2023). Антигъбните свойства на CuO-наночастици синтезирани с различни фракции на мукус и аскорбинова киселина бяха изследвани срещу четирите експериментални дрождеви вида, а получените резултати са представени на Фиг. 18.

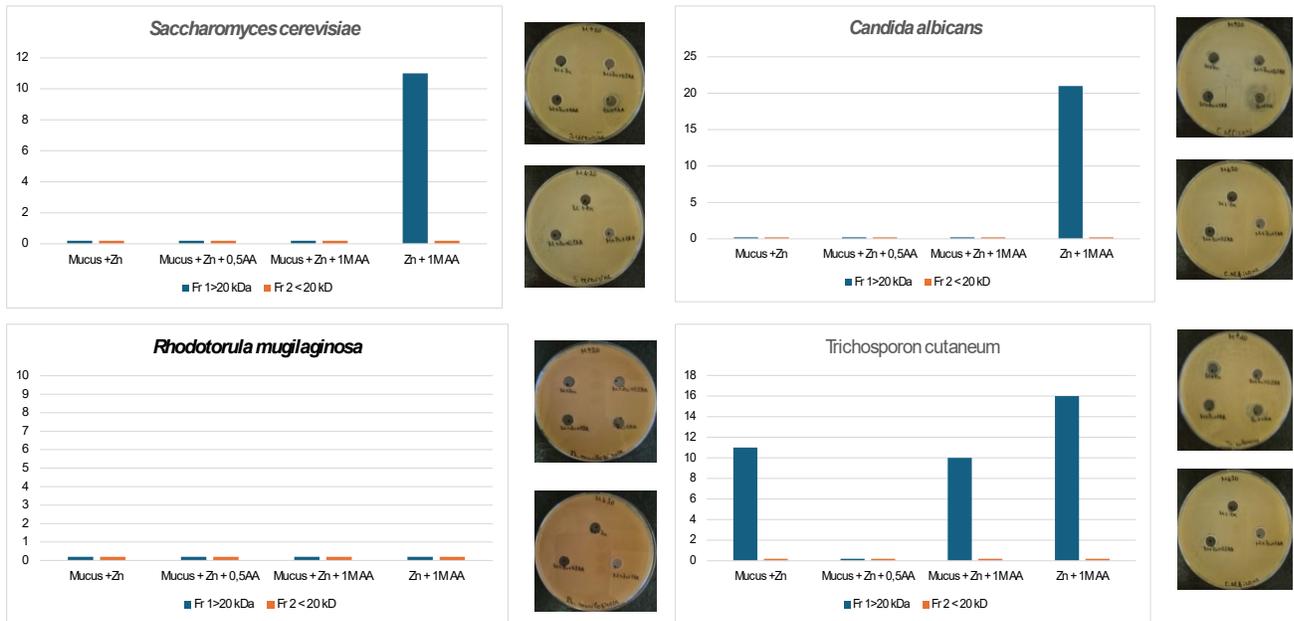


Фигура 18. Зони на инхибиране на растежа на *S.cerevisiae*, *C. albicans*, *R. mucilaginosa*, *T. cutaneum* при използване на CuO-наночастици в комбинации с фракции от мукус и/или аскорбинова киселина.

Подобно на резултатите за антигъбния ефект на Ag-наночастици с фракция мукус под 20 kD ($M_w < 20\text{kDa}$) и аскорбинова киселина и при CuO-наночастици, синтезирани с тази фракция, не бяха наблюдавани зони на инхибиране на растежа на експерименталните дрождеви видове. При изследване на проби на наночастиците, получени с фракции мукус над 20 kD се наблюдава вариabilен ефект. Инхибиране на растежа е отчетен само при един от видовете – *Saccharomyces cerevisiae*, като зоната е с диаметър от 21 mm. При останалите изследвани видове тази проба (мукус $M_w > 20\text{kDa}$ и CuO-наночастици), както и тези с добавяне на аскорбинова киселина (0,5M и 1M) не показваха антигъбен ефект. Добри инхибиращи растежа свойства обаче са установени при всички проби на наночастици получени в комбинация с редутор аскорбинова киселина (1M) спрямо изследваните дрождеви видове. Зоните на инхибиране на растежа варират от 13 mm (*Rh. mucilaginosa*) до 21 mm (*S. cerevisiae*).

В) Антигъбен ефект на Zn - наночастици

Zn-наночастици намират широко приложение в медицината поради техните антигъбни и антиоксидантни свойства. Антигъбният им ефект се дължи на прикрепяне към стената на дрождевите клетки, което води до промяна на тяхната структура и функционалност, изразяващи се в морфологични изменения и смърт на клетките (Tan et al., 2022; Djearmane et al., 2022). Вътреклетъчните нарушения са свързани най-вече с генерирането на оксидативен стрес и нарушения на редокс-баланса (Zhang et al., 2016). Резултатите от поведените експерименти за определяне на антигъбния ефект на Zn-НЧ в комбинация с мукус и аскорбинова киселина върху четирите дрождеви вида са представени на Фиг. 19.



Фигура 19. Зони на инхибиране на растежа на *S.cerevisiae*, *C. albicans*, *R. mucilaginosa*, *T. cutaneum* при използване на ZnO-наночастици в комбинации с фракции от мукус и/или аскорбинова киселина.

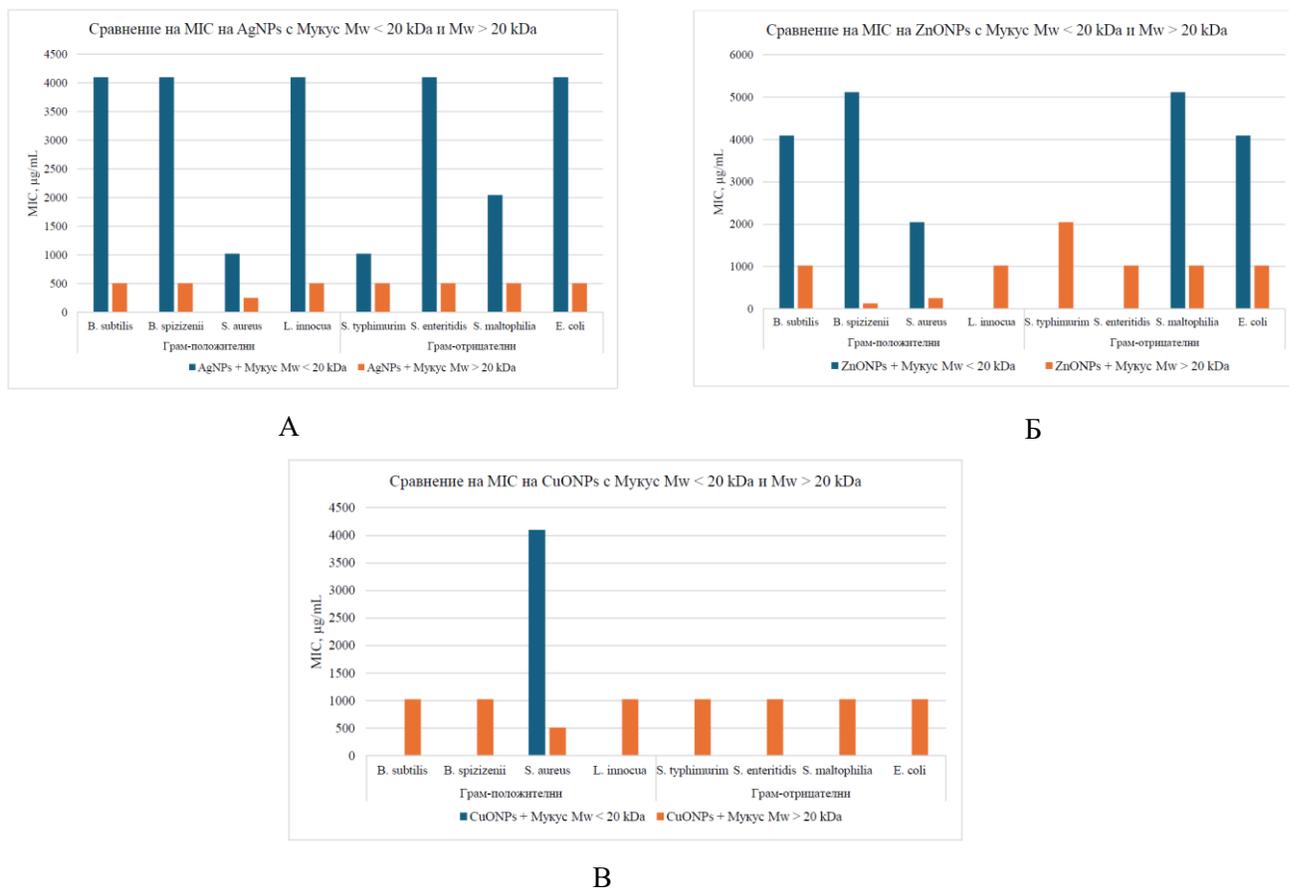
Комбинацията от ZnO-НЧ с мукус под 20 kD и добавена аскорбинова киселина, подобно на пробите с Ag- и Cu-НЧ, отново не показва антигъбен ефект срещу изследваните дрождеви видове. Антигъбни свойства бяха установени само при някои проби с мукус с $Mw > 20kDa$, както и при част от пробите с ZnO-наночастици, синтезирани с редутор аскорбинова киселина (1M) без мукус. Пробите с ZnO-наночастици и аскорбинова киселина притежават добър антигъбен ефект срещу видовете *S. cerevisiae*, *C. albicans* и *Tr. cutaneum*, като отчетените зони на инхибиране на растежа са между 11 mm и 21 mm. Видът *Rh. mucilaginosa* е резистентна към действието на действието на ZnO-наночастици, независимо от наличието или липсата на мукус и аскорбинова киселина във всички изследвани варианти. От друга страна, *Tr. cutaneum* е чувствителен към действието на Zn-наночастици, синтезирани с фракции мукус над 20kD (зона на инхибиране 11 mm) и аскорбинова киселина в концентрация от 1M (зона на инхибиране 10 mm).

Дейност 4.3: Характеризиране на биофилм деструктивните способности на формираните наночастици – планирана за изпълнение през ЕТАП 2 на проекта.

Дейност 4.4: Определяне на получените БНЧ-ци с най-силно изразен антибактериален ефект срещу определен микробен щам.

4.4.1. Сравнително изследване на антибактериалното действие на БНЧ-ци с мукус с $Mw > 20 kDa$ и БНЧ-ци с мукус с $Mw < 20 kDa$

След анализ на всички получени резултати беше установено, че наночастиците, синтезирани с мукус с $Mw > 20 kDa$, имат значително по-силна антибактериална активност от тези, синтезирани с мукус с $Mw < 20 kDa$. Разликите между тези две групи НЧ-ци са особено видими в стойностите им за MIC. На Фиг. 20 са представени сравнения между отчетените стойности на MIC на НЧ-ци с мукус с $Mw > 20 kDa$ и мукус с $Mw < 20 kDa$ за трите метални и метално-оксидни нанопрепарата – Ag-НЧ (А), ZnO-НЧ (Б) и CuO-НЧ (В).



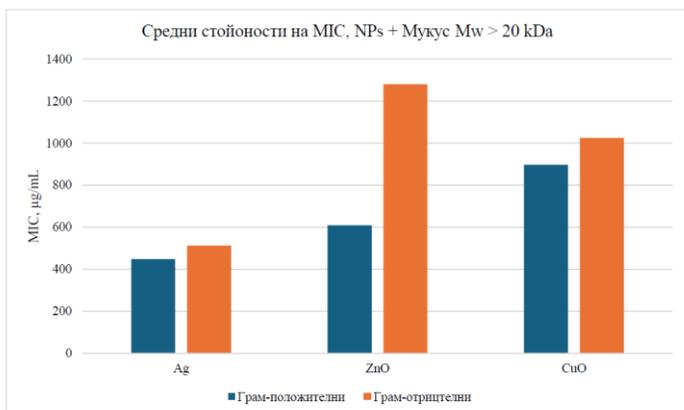
Фигура 20. Сравнителен анализ на стойностите на MIC ($\mu\text{g/mL}$) на Ag-НЧ (А), ZnO-НЧ (Б) и CuO-НЧ (В) с мукус с Mw > 20 kDa и Mw < 20 kDa за всички експериментални щамове.

Съществуват няколко възможни обяснения за по-доброто антибактериално действие на НЧ-ците с мукус с Mw > 20 kDa. На първо място фракцията мукус с Mw > 20 kDa съдържа антимикробни протеини в нея. Тази хипотеза се подкрепя от изследванията на Пит и кол., които установяват, че протеинът с най-силни антибактериални свойства в мукуса на *C. aspersum* (аспернин) е с молекулна маса 37,4 kDa (Pitt et al., 2019). Същият екип изказва и предположение, че в мукуса на *C. aspersum* може да има и аналог на антимикробния протеин ахацин с Mw = 59 kDa. На второ място фракцията с мукус с Mw > 20 kDa е богата на муцини и други гликопротеини, чиито олигозахаридни вериги са описвани като добри редуциращи агенти за синтеза на наночастици (Hendler et al., 2011). Поради това тази фракция може да води до образуване на наночастици с по-добри антибактериални свойства – по-малък размер, правилна форма и др. Освен това големите гликопротеини образуват матрикс, който свързва наночастиците, стабилизира ги и не им позволява да агрегират, което увеличава антибактериалното им действие. Мане и кол. например съобщават за добра стабилизация и разпръснатост на сребърни наночастици в матрикс от мукуса на *A. fulica* (Mane et al., 2021).

4.4.2. Сравнително изследване на антибактериалното действие на синтезираните БНЧ-ци при Грам-положителни и Грам-отрицателни тест-щамове

Ag и CuO наночастици, синтезирани с мукус с Mw > 20 kDa, имат съизмерими стойности на MIC при 7 от 8 тествани щам, с изключение на *S. aureus*, където стойностите на MIC са по-ниски. По-различно стоят нещата при ZnO наночастици, които проявяват значително по-силен антибактериален ефект върху Грам-положителните щамове (Фиг. 21). При ZnO-НЧ с мукус с Mw > 20 kDa, средната стойност за MIC

при Грам-положителните щамове е 608 $\mu\text{g/mL}$, докато при грам-отрицателните – 1280 $\mu\text{g/mL}$. Тази селективност в действието на ZnO-НЧ е докладвана и от Голд и неговия екип през 2018 г. (Gold et al., 2018).



Фигура 21: Средни стойности на MIC ($\mu\text{g/mL}$) на НА-ци с мукус с Mw > 20 kDa от всички осем експериментални щам

Получените резултати в настоящия експеримент, са сходни с резултатите, съобщени от други автори, макар и с по-ниски MIC - Ag и ZnO-НЧ имат MIC = 256 $\mu\text{g/mL}$ при *S. aureus*, докато при *E. coli* са съответно 512 и 1024 $\mu\text{g/mL}$. Раджа и кол. също така определят, че *S. aureus* е по-чувствителен към сребърни и цинкови наночастици, отколкото към медни – MIC = 625 $\mu\text{g/mL}$ за Ag и Zn-НЧ и MIC = 1250 $\mu\text{g/mL}$ за Cu-НЧ (Raja et al., 2023). В проведените експерименти бе отчетено двойно по-ниски стойности за MIC за Ag и ZnO-НЧ в сравнени с CuO при *S. aureus* - MIC = 256 $\mu\text{g/mL}$ срещу MIC = 512 $\mu\text{g/mL}$ съответно. Това показва, че *E. coli* е по-нечувствителна към действието на Ag, ZnO и CuO-НЧ в сравнение с *S. aureus*, което е в съгласие с резултатите на по-горе цитирания авторски колектив (Raja et al., 2023).

РАБОТЕН ПАКЕТ 5: ОПРЕДЕЛЯНЕ НА МЕХАНИЗМА НА ДЕЙСТВИЕ НА БНЧ-ЦИ С НАЙ-СИЛНО ИЗРАЗЕН АНТИБАКТЕРИАЛЕН ЕФЕКТ СРЕЩУ ОПРЕДЕЛЕН МИКРОБЕН ЩАМ

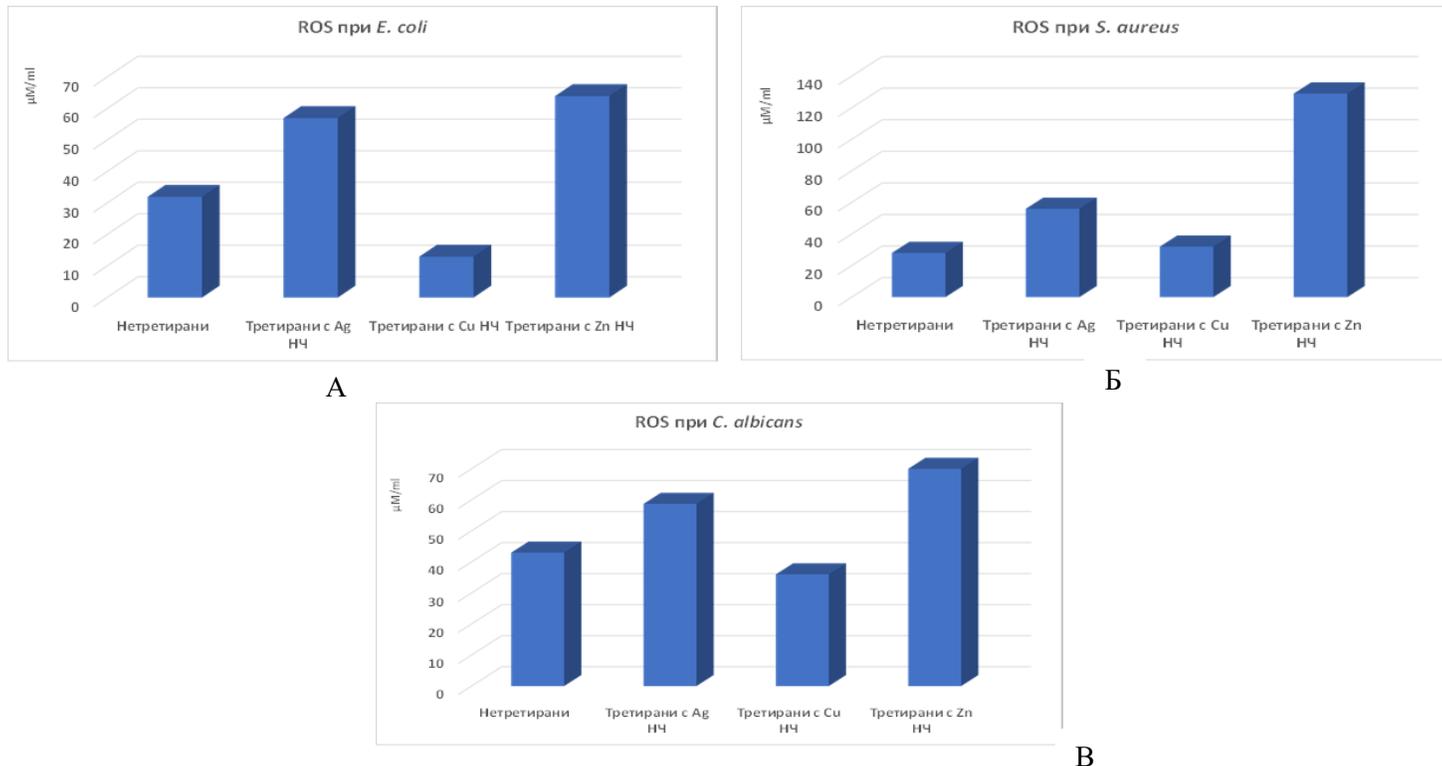
Многобройните проучвания през последните години на антимикробните механизми на действие на металните НЧ-ци показват, че наред с индукцията на оксидативен стрес, освобождаване на метални йони и неокислителни механизми, металните нанопрепарати действат върху микробната клетка, инхибирайки едновременно различни метаболитни пътища, което е едно от основните им предимства за ограничаване на развитието на антимикробна резистентност. Ето защо основна цел на **Работен пакет 5: Определяне на механизма на действие на БНЧ-ци с най-силно изразен антибактериален ефект срещу определен микробен щам** е да се проследи механизма на токсично действие на най-високо ефективните БНЧ-ци от слузта на градинския охлюв *Cornu aspersum* (Ag, ZnO и CuO с фракция от мукус с Mw>20 kDa) върху изследваните микроорганизми и какви необратими вътреклетъчни повреди настъпват при излагане на тяхното въздействие.

Дейност 5.1. Характеризиране на ефекта на най-активните БНЧ-ци върху нивото на вътреклетъчни повреди.

Ефектът на получените нанопрепаратите върху окислително-редукционния баланс в клетката беше оценен чрез проследяване на два ключови вътреклетъчни параметъра, а именно: количеството на генерирани реактивни кислородни видове (ROS) и нива на карбонилни групи в микробните белтъци.

5.1.1. Определяне на нивата на ROS

За изследване на изменението в нивата на вътреклетъчни ROS, клетките на трите микробни щама – *E.coli*, *S. aureus* и *C. albicans* бяха третирани с дози равни на IC₅₀ от получените нанопрепарати за 1h на стайна температура. След отстраняване на металните НЧ-ци бяха получени безклетъчни екстракти, които бяха използвани за провеждане на сравнителен анализ на ефекта на 3 вида метални бионаночастици - Ag, CuO и ZnO (Фиг. 22А, Б, В).

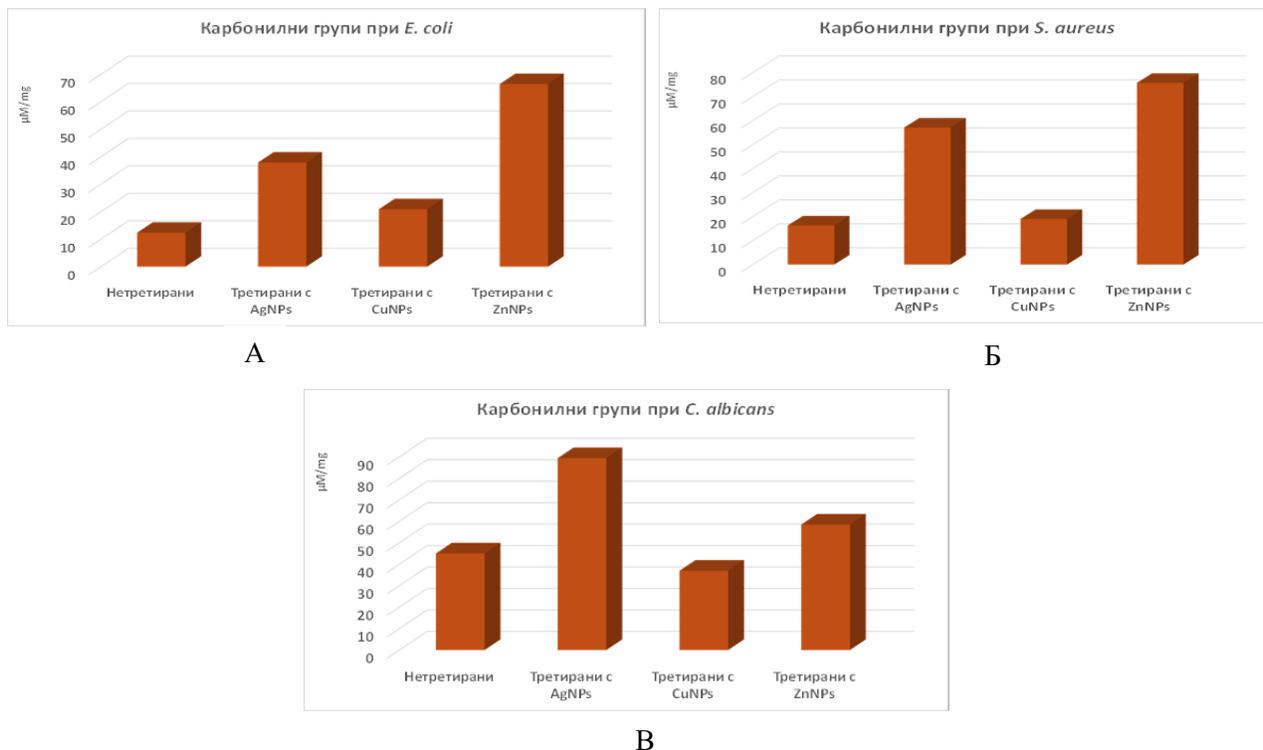


Фигура 22: Нива на генерирани ROS при щамове *E.coli* (А), *S. aureus* ATCC 6538 (Б) и *C. albicans* ATCC 10231 след третиране с IC₅₀ на Ag, CuO и ZnO бионаночастици, получени с редуктор екстракт от слуз на *Cornu aspersum* с Mw > 20 kD

При Грам-положителните бактерии и по-конкретно при *S. aureus*, получените резултати отново показват, че количеството на реактивни кислородни видове е най-високо след третирането с ZnO-БНЧ - 129 µM/ml. В сравнение с 2-та бактериални щама (*S. aureus* и *E. coli*), при дрождевия шам *C. albicans* се генерират най-високи нива на реактивни кислородни видове. Наночастиците, предизвикващи най-силен оксидативен стрес са цинковите с установена концентрация 70 µM/ml, следвани от пробите, третирани със сребро - 58,7 µM/ml. При нетретирани и тези, които са третирани с CuO-НЧ не се наблюдават значителни повишения в нивата на ROS. При контролата се измерва концентрация от порядъка на 43 µM/ml, докато при клетките, третирани с медни наночастици тя е 36 µM/ml.

5.1.2. Определяне на нивата на карбонилирани протеини

Проведеният сравнителен анализ на действието на 3-те вида метални бионаночастици - Ag, CuO и ZnO върху нивото на окисление на вътреклетъчните протеини в клетките на *E. coli* и *S. aureus* показва, че ZnO БНЧ-ци предизвикат най-висок оксидативен стрес, водейки до повишаване на нивата на карбонилирани протеини с над 300 % и достигане до стойности съответно от 66,46 µM/mg и 75,72 µM/mg (Фиг. 23А и Б).



Фигура 23: Вътреклетъчни нива на карбонилирани протеини при щамове *E. coli* (А), *S. aureus* ATCC 6538 (Б) и *C. albicans* ATCC 10231 след третиране с IC_{50} на Ag, CuO и ZnO бионаночастици, получени с редуктор екстракт от слуз на *Cornu aspersum* с $Mw > 20$ kD

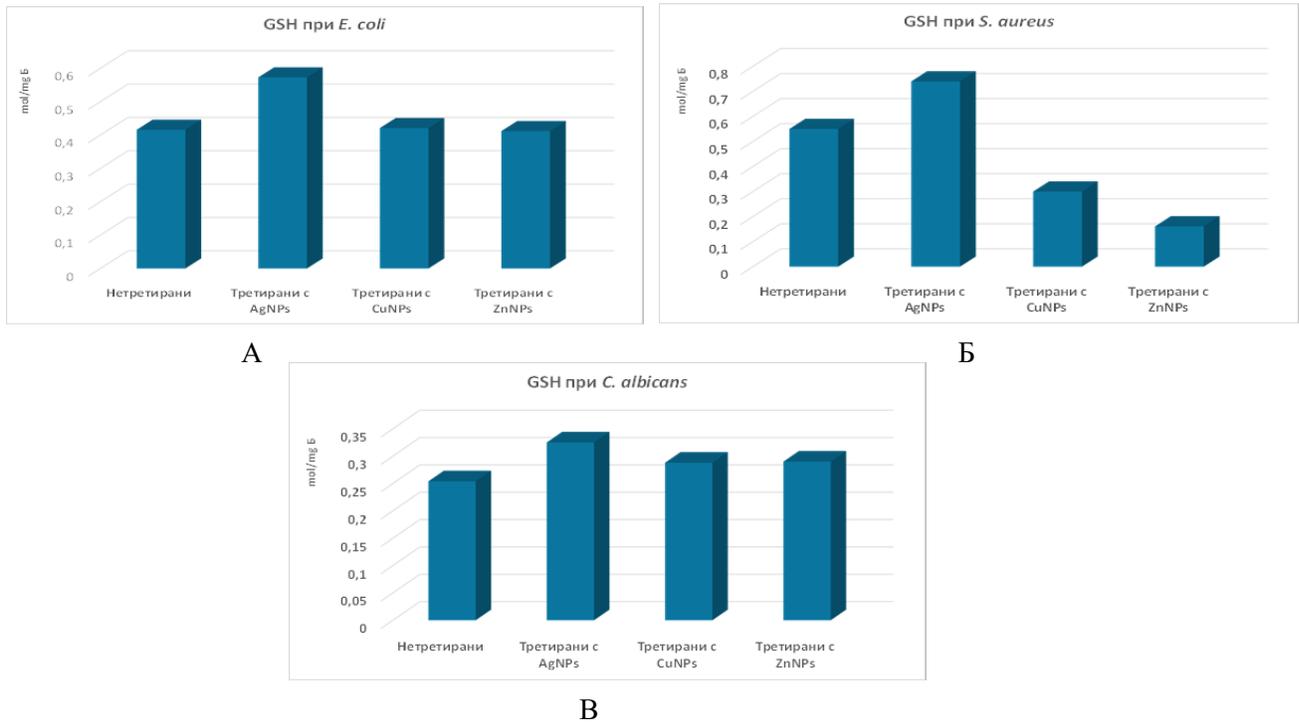
В сравнение с 2-та бактериални щам (*S. aureus* и *E. coli*), при дрождевия щам *C. albicans* се генерира най-високо количество карбонилирани протеини. Подобно на ZnO-НЧ, сребърните също предизвикват оксидативен стрес, което води до натрупване на окислени форми на вътреклетъчните белтъци. На Фиг. 23В ясно се вижда, че пробите, третирани със сребро, са с най-висок процент карбонилни групи- 89,41 $\mu\text{M}/\text{ml}$, което означава, че имаме двойно увеличение спрямо нетретираниите проби- 45 $\mu\text{M}/\text{ml}$.

Дейност 5.2. Характеризиране на ефекта на най-активните БНЧ-ЦИИ върху микробната антиоксидантна активност.

Клетъчната антиоксидантна защитна система играе ключова роля в поддържането на клетъчната хомеостаза и защита срещу окислителния стрес, който може да доведе до увреждане на ДНК, протеини и липиди. С цел да се изясни ефектът на действие на металните нанопрепарати върху ключови компоненти от клетъчната антиоксидантна защитна система бяха изследвани следните нейни компоненти: Нива на редуциран вътреклетъчен глутатион (GSH); Специфична каталазна активност; Специфична тотална супероксид дисмутазна активност (СОД).

5.2.1. Определяне на вътреклетъчните нива на редуциран глутатион

Редуцираният глутатион (GSH) представлява мощен антиоксидант, който предпазва клетката от вредни вещества и има важна функция при защитата на клетките от оксидативен стрес, тъй като неутрализира свободните радикали и ROS. Това е и причината да бъде определян като основен вътреклетъчен антиоксидант, поддържащ клетъчната цялост (Фиг. 24А, Б, В).

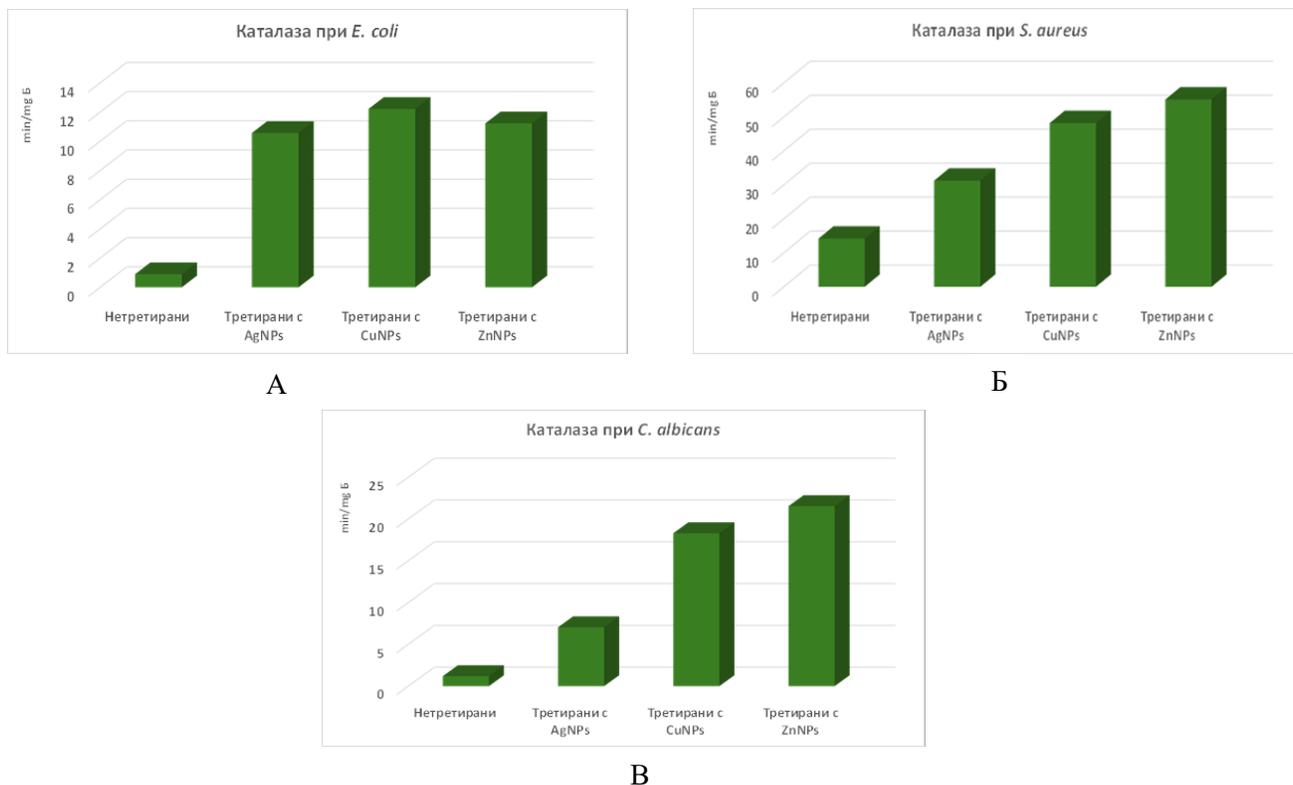


Фигура 24: Нива на вътреклетъчен редуциран глутатион при шамове *E.coli* (А), *S. aureus* ATCC 6538 (Б) и *C. albicans* ATCC 10231 (В) след третирание с IC_{50} дози Ag, CuO и ZnO бионаночастици

Получените резултати показаха, че при *E.coli* (Фиг. 24А), третирането със сребро, обуславя най-високи нива на GSH - 0,573 mol/mg. Това може да се счита като индикатор за повишена антиоксидантна защита на клетките. Липсата на повишени нива на GSH при третирание на клетката с CuO и ZnОНЧ предполага значително увреждане на този механизъм на антиоксидантно действие и невъзможност на клетките да се справят с високите нива на генерирани ROS, което съответно води до нарушаване на редокс хомеостазата и последваща смърт на клетката. При Грам-положителният шам *S. aureus*, резултатите отново показаха, че Ag-БНЧ водят до най-силно повишаване на експресията на глутатион в клетката - 0,74 mol/mg (Фиг. 24Б). При дрождевия шам *C. albicans* почти не се наблюдават изменения в нивата на синтезиран вътреклетъчен глутатион (Фиг. 24В). Наблюдаваната липса на повишена експресия на този трипептид при гъби най-вероятно се дължи на факта, че тези микроорганизми като цяло понасят по-високи концентрации на метали от бактериите и секретират множество извънклетъчни редокс протеини, обезвреждайки действието на приложените метални наноматериали (Kitching et al., 2015)

5.2.2. Определяне на специфична каталазна активност

Каталазата е един от основните антиоксидантни ензими в организма, който защитава клетките от оксидативен стрес, предизвикан от натрупването на водороден пероксид, който може да бъде токсичен. Ефектът на тестваните БНЧ-ци върху този ключов антиоксидантен ензим беше анализиран чрез измерване на тотална специфична каталазна активност в получени безклетъчни екстракти на клетки, третирани с 3-те вида метални бионаночастици- Ag, CuO и ZnO (Фиг. 25А, Б, В).



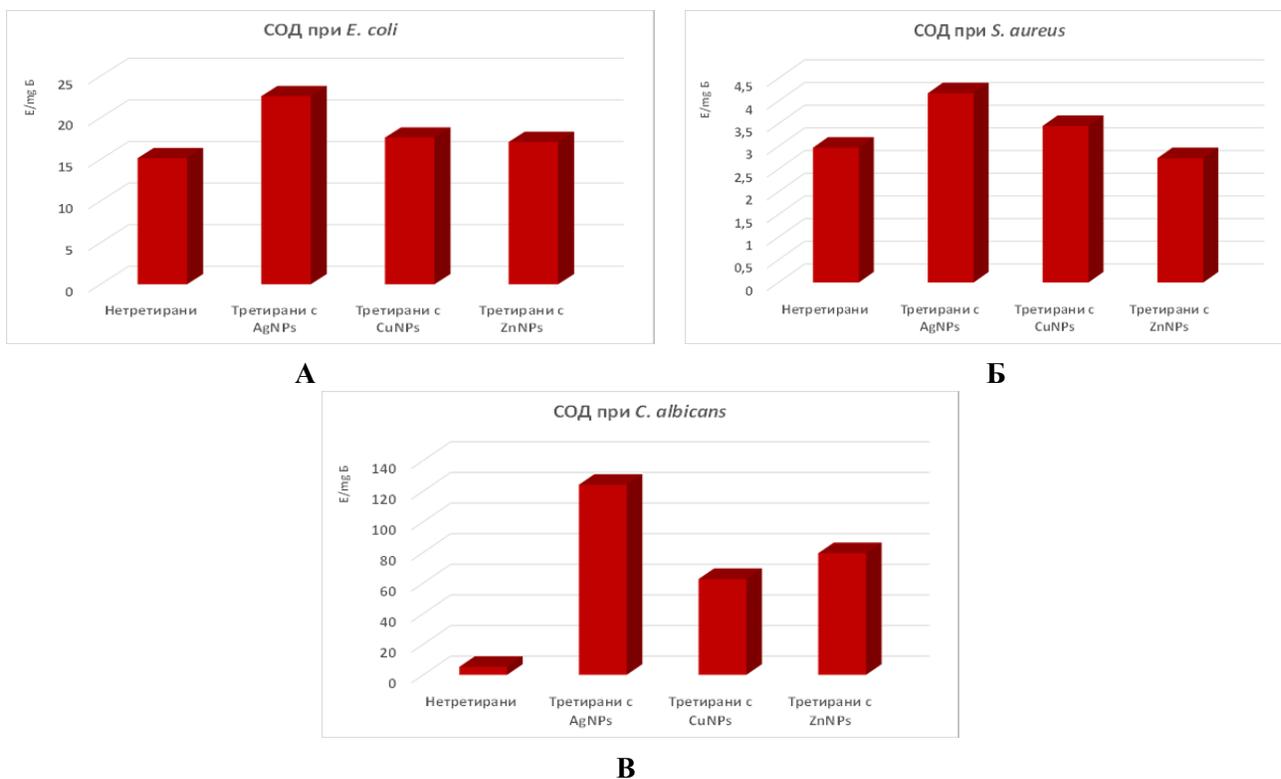
Фигура 25: Обща специфична каталазна активност при щамове *E.coli* ATCC 8739 (А), *S. aureus* ATCC 6538 (Б) *C. albicans* ATCC 10231 след третиране с IC₅₀ дози Ag, CuO и ZnO бионаночастици.

В клетките на Грам-отрицателния тест микроорганизъм *E. coli* специфичната каталазна активност беше сходна и при трите изследвани нанопрепарата (Фиг. 25А). Наблюдаваното увеличение в експресията на този ензим в сравнение с нетретираната контрола (0,9 E/mg) беше десетократно, което предполага, че този ензим има сходно ключово участие при защитата на клетките от оксидативен стрес, получен вследствие въздействието и с трите типа НЧ-ци. Най-висока каталазна активност бе отчетена след третиране с CuO-БНЧ - 12,22 min/mg. При проведените се експерименти с *S. aureus*, представител на Грам-положителните бактерии, беше установено, че при третиране с ZnO-БНЧ се регистрира най-висока каталазна активност - 55,14 min/mg (Фиг. 25Б). При изследване на дрождевия щам *C. albicans* бе показано, че най-висока каталазна активност се наблюдава при клетките, третиращи с ZnO-НЧ - 21,54 min/mg, което е 20 пъти повече от контролната проба (Фиг. 25В). Сравнително близък резултат се отчита и при пробите, третиращи с мед, а именно 18,3 min/mg. Тази стойност от своя страна, е около 2 пъти повече от стойността, която се измерва при проби, третиращи със сребро - 7,05 min/mg.

5.2.3. Определяне на специфична супероксид дисмутазна активност

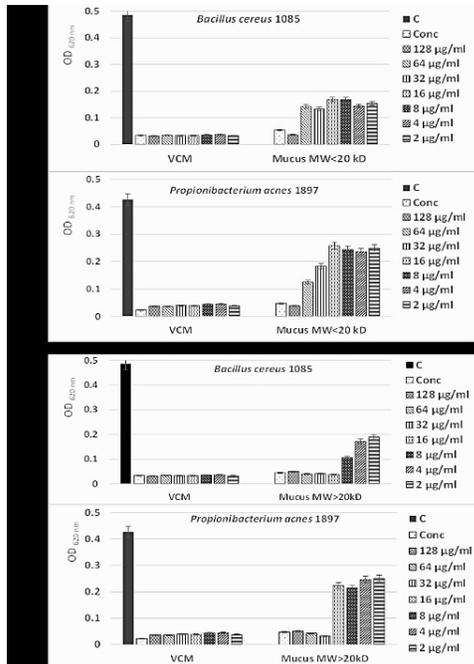
Супероксид дисмутаза (СОД) е ензим, който играе ключова роля в защитата на клетките от оксидативен стрес. Той катализира дисмутацията на супероксидни радикали (O_2^-) до водороден пероксид (H_2O_2) и кислород (O_2). Ефектът на тестваните БНЧ-ци върху нивата на експресия на СОД, в клетки на изследваните три микробни щам, беше анализиран чрез измерване на тотална специфична СОД активност в получени безклетъчни екстракти на клетки, третиращи с 3-те вида метални бионаночастици- Ag, CuO и ZnO (Фиг. 26А, Б, В). Изследването на клетки от *E.coli* ATCC 8739,

подложени на въздействието на Ag, CuO и ZnОБНЧ-ци, получени с редуктор слуз от охлюв *C. Aspersum* с Mw>20 kDa, показва, че при този шам не се наблюдава значително повишаване в специфичната СОД активност (Фиг. 26А). Най-високи стойности бяха отчетени след въздействие със Ag-БНЧ - 22,6 Е/mg. При изследване на бактериалния шам *S. aureus*, отново третирането със Ag-БНЧ предизвика най-голямо увеличение в експресията на СОД - 4,17 Е/mg Б, която е почти 2 пъти по-висока от тази на контролната проба - 2,97 Е/mg Б (Фиг. 26Б). Измерените стойности за CuO-НЧ и ZnO-НЧса съответно - 3,45 Е/mg и 2,714 Е/mg. При дрождевия шам *C. albicans* най-висока СОД активност беше отчетена след излагане на въздействието на Ag-БНЧ - 124,12 Е/mg (Фиг. 26В). Тази повишена активност показва, че дрождите активно реагират на оксидативния стрес, което от своя страна може да бъде свързано с адаптивния механизъм за защита на клетките срещу повишени нива на супероксидни радикали. Най-ниска активност на ензима супероксид дисмутаза, беше установен при контролните проби - 5,2 Е/mg. Стойностите, отчетени при клетки, третирани с медни (62,54 Е/mg) и цинкови (79,41 Е/mg) бионаночастици са сходни и са двукратно по-ниски сравнение с измерената специфична СОД активност след третиране със сребърни бионаночастици.



Фигура 26: Обща специфична СОД активност при щамове *E.coli* ATCC 8739 (А), *S. aureus* ATCC 6538 (Б) и *C. albicans* ATCC 10231 след третиране с IC₅₀ дози Ag, CuO и ZnO бионаночастици.

Допълнителни на заложените в Работната програма на ПРОЕКТА изследвания:

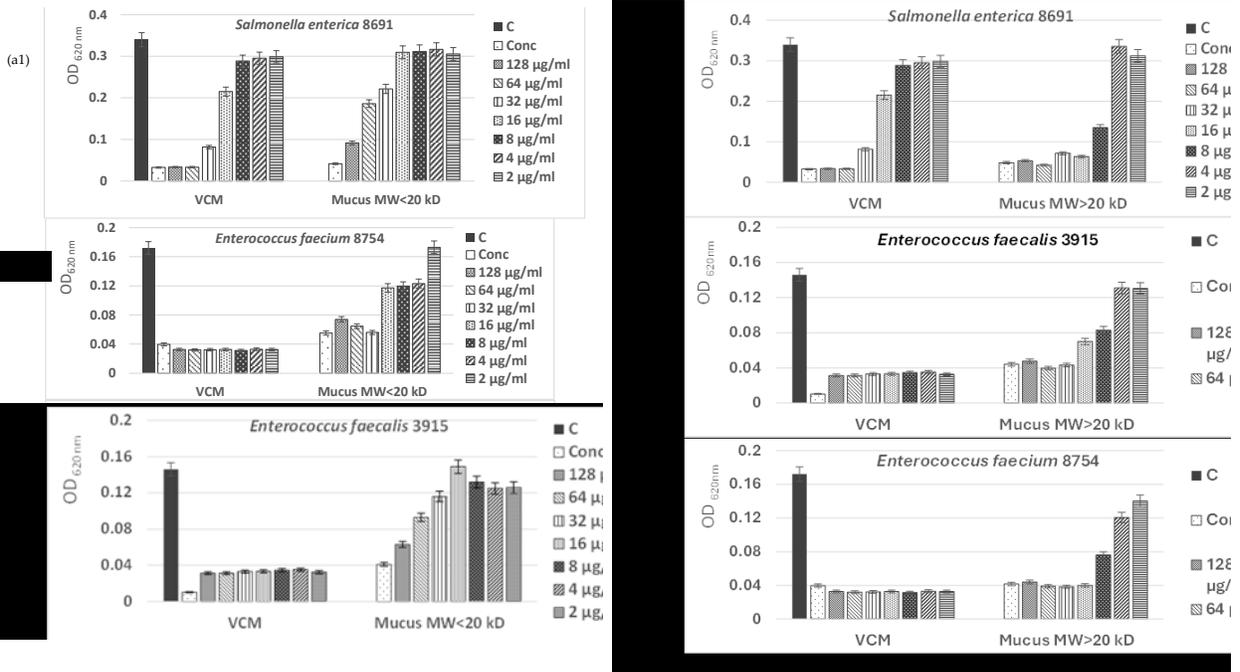


Фигура: 27 Антибактериална активност на две служни фракции от охлюв *C. aspersum* с Mw < 20 kDa (a1, a2,) и Mw > 20 kDa (b1, b2) срещу избрани грам-положителни патогенни щамове. Като положителна контрола се използва антибиотикът Vancomycin (VCM). Контролата (C) представлява нетретираните клетки.

Откриването и изследването на нови естествени съединения с антимикробна активност е потенциална стратегия за намаляване на разпространението на антимикробна резистентност. Ето защо беше проучен и антибактериалния потенциал на двете фракции от слюз от *Cornu aspersum* с Mw < 20 kDa и Mw > 20 kDa срещу пет бактериални патогена - *Bacillus cereus* 1085, *Propionibacterium acnes* 1897, *Salmonella enterica* 8691, *Enterococcus faecalis* 3915 и *Enterococcus faecium* 8754. Антибактериалният ефект на изследваните две фракции мукус беше оценен чрез анализ на стойностите на минималната инхибираща концентрация (MIC) (Фиг. 27 a, b).

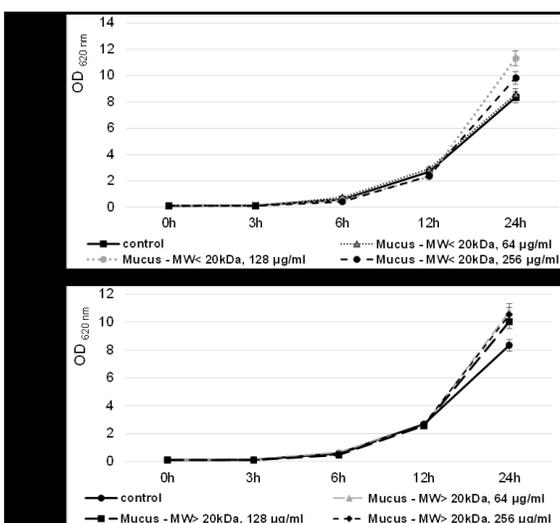
Стойностите на MIC, представени на Фигура 27 a, b, показват по-висок антимикробен потенциал на фракцията с Mw > 20 kDa на слюз от *C. aspersum* в сравнение с фракцията с Mw < 20 kDa. При нея се наблюдава повече от 90% инхибиране на микробния растеж на Грам+ патогенни бактериални изолати *Bacillus cereus* 1085 и *Propionibacterium acnes* 1897 при концентрации от 32 – 128 µg/ml. Освен това, ефектът срещу Грам+ микроорганизми на биоактивните съединения в тази фракция се наблюдава дори при ниски концентрации (2 – 4 µg/ml), имащи стойности по-високи от IC₅₀.

Беше установена и добре изразена антимикробната активност на мукусната фракция с Mw > 20 kDa и срещу Грам-отрицателни бактерии - *S. enterica* 8691, *E. faecalis* 3915, *E. faecium* 8754. Дори при концентрации от 8 µg/ml се постига повече от 70 % инхибиране на бактериалния растеж (Фигура 28 a, b). Анализът на пептидната фракция с Mw < 20 kDa от слюз от *C. aspersum* също показва наличието на добре изразен антибактериален ефект (Фигура 28a). Въпреки това отчетените стойности на IC₅₀ са по-ниски от тези на протеиновата фракция с Mw > 20 kDa. Те варират между IC₅₀ - IC₈₀ срещу Грам+ бактерии и имат максимална IC₇₀ срещу Грам- щамове при най-високите тествани концентрации на слюз. Най-слабият ефект е отчетен за *S. enterica* 8691.



Фигура 28: Антибактериална активност на фракции слюз от *C. aspersum* с Mw < 20 kDa (a) и Mw > 20 kDa (b) срещу избрани Грам (-) патогенни щамове. Като положителна контрола се използва антибиотикът ванкомицин (VCM). Контролата (C) представлява нетретираните клетки. Третиранията се провеждат с концентрирани (Conc) и разредени фракции от слюз от охлюви.

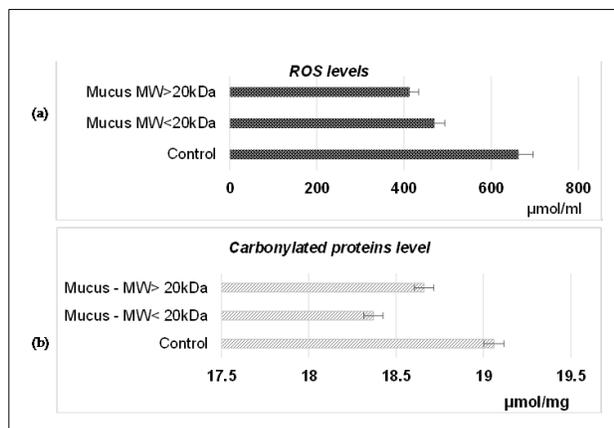
Изследван бе и *in vitro* и *in vivo* ефектът на охлювната слюз върху развитието и размножаването на еукариотните клетки. Като моделна система на еукариотна клетка за оценка на ефекта на двете изолирани биоактивни фракции на слюзта на *C. aspersum* бяха използвани дрождите *S. cerevisiae*. Беше проведен “Time kill” тест, който показва, че жизнеспособността на третираните със слюз клетки на *S. cerevisiae* не се повлияват негативно (Фигура 29.). Дори на 24-ия час от култивирането, след добавяне към хранителната среда на слюз от охлюв не беше наблюдаван токсичен ефект върху дрождевите клетки, напротив беше установено стимулиране на растежа, показващо 3 – 30% увеличение на клетъчната биомаса.



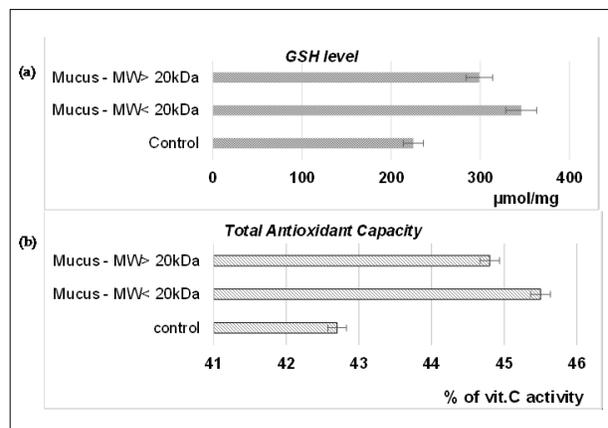
Изследван бе и възможният цитотоксичен ефект на изолираните биоактивни фракции от слюз от охлюви върху еукариотната клетка. Клетките на *S. cerevisiae* бяха третираните с концентрации на двете фракции, надвишаващи тези, използвани за характеризиране на тяхната антибактериална активност. След проведеното третиране бяха анализирани настъпилите промени в нивата на вътреклетъчно генерирани ROS и карбонилирани протеини (Фигура 30). Беше установено, че в клетките, третираните с 256 µg/ml слюз от охлюви или с Mw < 20 kDa, или с Mw > 20 kDa, генерирането на ROS намалява с 29% до 38%, съответно, в сравнение с

Фигура 29: Ефект на мукусна фракция на *C. aspersum* с Mw

нетретираните клетки (Фигура 30 а). Едновременно с това, вътреклетъчните нива на окислени протеини не се различават значително при третиран и нетретиран клетки, вариращи между $18,37 \pm 0,98$ и $19,06 \pm 0,87 \mu\text{mol}/\text{mg}$ протеин (Фигура 30b). За да се оцени възможният механизъм, включен в стимулиращия растежа и цитопротективния ефект на екстрактите от охлюви *C. aspersum* върху еукариотни клетки на *S. cerevisiae*, бяха оценени вътреклетъчните нива на GSH и обща антиоксидантна активност (ОАА) (Фигура 31). Беше показано, че излагането на двете фракции на слюз с $M_w < 20 \text{ kDa}$ и $M_w > 20 \text{ kDa}$ води до повишаване на вътреклетъчното ниво на GSH съответно с 35 % и 25 % (Фигура 31a). Същата тенденция се наблюдава, когато се оценява ОАА. Третирането на клетките на *S. cerevisiae* със слюз на охлюв води до увеличаване на общия антиоксидантен капацитет на клетката (Фигура 31b).



Фигура 30: Вътреклетъчни нива на ROS (а) и карбонилирани протеини (б) в *S. cerevisiae* NBMCC 584 клетки, култивирани в присъствието на фракции на слюз от *C. aspersum* с $M_w < 20 \text{ kDa}$ и $M_w > 20 \text{ kDa}$.



Фигура 31: Ефект на фракциите от слюз на *C. aspersum* с $M_w < 20 \text{ kDa}$ и $M_w > 20 \text{ kDa}$ върху вътреклетъчните нива на глутатион (GSH) (а) и обща антиоксидантна активност (ОАА) (б) при *S. cerevisiae* NBMCC 584

Проведените изследвания показват, че и двете изолирани фракции от екстракт от слюз на *C. aspersum* с $M_w < 20 \text{ kD}$ и $M_w > 20 \text{ kDa}$ не само не са цитотоксични за тестваните еукариотни клетки на *S. cerevisiae*, а притежават стимулиращ растежа потенциал. Още повече, добавянето на двете слюзни фракции към хранителната среда води до значително намаляване на нивата на ROS. Получените резултати предполагат, че слюзта на *C. aspersum* притежава възможности за детоксикация на генерираните ROS, което автоматично води до намаляване на нивото на карбонилирани протеини в еукариотните организми. По този начин двете изолирани биоактивни фракции от *C. aspersum* могат не само да се използват ефективно за лечение на резистентни към антибиотици патогени, но тяхното прилагане има и допълнителни благоприятни ефекти, свързани с намаляването на оксидативния стрес в клетките на организма гостоприемник.

Автори:

Доц. д-р Венцислава Петрова
Гл. ас. д-р Емилия Писарева
Доц. д-р Анна Томова

БЛАГОДАРНОСТ: Проект №: КП-06-Н61/8 от 15.12.2022 г. „Разработване на нови биологични наночастици от слюзта на градински охлюв *Cornu aspersum* като антимицробни агенти“, финансиран от Фонд за научни изследвания на Република България.