

СТАНОВИЩЕ

от: проф. д-р Мариела Константинова Оджакова-Байтошева, член на Научно жури, назначено със заповед №РД-09-15/30.01.2025 г. на Директора на ИОХЦФ, БАН, проф. д-р В.Куртева

ОТНОСНО: конкурс за заемане на академичната длъжност “професор” в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.2. Химически науки, научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологичноактивните вещества“, за нуждите на лаборатория „ХБПЕ“, ИОХЦФ, БАН - ДВ, бр. 104 от 10.12.2024 г.

Общо представяне на процедурата и кандидата

В конкурса за професор в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.2. Химически науки, научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологичноактивните вещества“ се явява един кандидат – доц. д-р Людмила Георгиева Велкова, ИОХЦФ, БАН.

Представените материали за участие в конкурса са изготвени в съответствие с изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ИОХЦФ, БАН.

Доц. Велкова е завършила висшето си образование в СУ ”Св. Климент Охридски”, Факултет по химия и фармация. През 2012 г. като докторант на самостоятелна подготовка придобива образователна и научна степен „доктор“.

Доц. Велкова е работила в ИОХЦФ, БАН последователно като химик (2003-2009); асистент (2013); гл. асистент (2013-2019). От 2019 г. е доцент в професионално направление 4.2. Химически науки, научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“

Била е на краткосрочни специализации в престижни чуждестранни институции: Институт по биохимия и Институт по клетъчна биология, Университет Тюбинген – Германия; Институт по биология, Университет Падуа – Италия; Институт по вирусология в Киев, Украйна; Университета в Гент, Белгия .

Представен е списък с получени 10 грамоти и награди, придружен с доказателствен материал.

Покриване на минималните държавни изисквания за академичната длъжност Професор

Доц. Велкова е съавтор в общо в 72 публикации; 10 патенти и полезни модели, два университетски учебника и една колективна монография. Общият брой публикации извън конкурси по придобиване на научната и образователна степен „доктор“ и академичната длъжност „доцент“ е **38**, от които в настоящия конкурс за придобиване на академичната длъжност „професор“ се използват **28**.

Представената научна продукция и постигнатите наукометрични данни надхвърлят минималните изисквания за присъждане на академичната длъжност „професор“, определени в Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ИОХЦФ, БАН. Представени са данни за покриване на изискванията по показатели както следва:

Показатели от група А: дисертационен труд - 50 т.;

Показатели от група В: хабилитационен труд – 145 т. при изискуем минимум 100 т.(5 публикации с Q1; 1 - Q2);

Показатели от група Г: публикации в списания с ИФ/ИР- 451 т. при изискуеми 250 т. (5 публикации с Q1; 6 - Q2; 8 – Q3; 3- Q4 и 2 полезни модела).

Показатели от група Д: цитирани трудове – 530 т. при изискуеми 200 т.

Показатели от група Е: Предоставени са данни за постигнати 602 точки при изискуем минимум 150 т. Доц. Велкова е участвала и участва в 17 национални и 15 международни научни проекта и е ръководила 2.5 национални научни проекти .

Доц. Велкова участва активно и в учебно-образователния процес. Била е ръководител на 4 студенти по линия на студентски практики; ръководила е семинарни занятия по „Добра лабораторна и производствена практика в биоиндустриите“, Магистърска програма "Биобизнес и биопредприемачество". Извеждала е упражнения и лекции в Магистърска програма "Качество и безопасност на храните" в БФ, СУ. Доц. Великава е участвала и участва и в обучението на 14 дипломанти и специализанти.

Оценка на научната и научно-приложна дейност

Всички научни трудове, представени за участие в конкурса, са изцяло в областта на обявения конкурс. Основен акцент в представените изследвания е характеризирани на биологично-активни вещества (пептиди, протеини и гликопротеини) в слузта и хемолимфата на Гастроподи с антимикробна, антитуморна, антиоксидантна и регенеративна активност, изясняване на механизма им на действие и възможностите за тяхното приложение. Представените в конкурса научни приноси са резултат от интердисциплинарни изследвания и могат да бъдат обобщени в няколко тематични направления:

1. Идентифициране и характеризирани на биокомпоненти от Гастроподи с антимикробна активност.

За първи път е доказан антибактериалният потенциал на 5 пептидни фракции с различно МТ, получени чрез ултрафилтрация на пречистен екстракт от слуз на градински охлюв *C. aspersum*, срещу редица Грам+ и Грам– бактерии. Масспектрометричните анализи идентифицират множество пептиди с МТ под 3 кДа, както и полипептиди с МТ между 4 - 8 и 10 - 20 кДа. Идентифицирани са първичните структури на над 30 нови пептиди с МТ под 3 кДа, чрез *de novo* секвениране и интерпретиране на резултатите от MALDI-TOF-MS/MS спектри. Характеризирането им чрез физикохимични параметри като молекулна маса, изоелектрични точки (pIs), голяма средна стойност на хидропатичност (GRAVY) и нетен заряд, разкрива богато разнообразие от амфипатични структури, което е от съществено значение за тяхната селективност и антибактериална активност. Сравняването на аминокиселинните им последователности с база данни за АМП разкрива висока хомология с други богати на глицин АМП, като акантоскурин, ктенидин, прокамбарин, микроцин Б, с богатия на Gly/Leu антимикробен пептид лептоглицин, както и с дефензин-подобен протеин, различни форми на галинацин, шеферин и др. Софтуерният анализ прогнозира антибактериална, противогъбична и антивирусна активност на новооткритите пептиди, което ги прави потенциални кандидати за нови антимикробни терапевтици. Въз основа на тези открития е защитен полезен модел за състав с антибактериално действие срещу *Pseudomonas aureofaciens*, *Brevibacillus laterosporus* и *Escherichia coli*.

На базата на резултати от *in silico* симулации на молекулярна динамика е предложена хипотеза за спонтанното образуване на пептидни наноструктури (кълъстери) в слузта на *C. aspersum*. Чрез разработена методология, основана на UV-Vis спектроскопски и флуоресцентни изследвания, и *in vitro* тестове за антибактериална активност, е установено, че пептидите p1 (KVKDNQWRP) и p3 (LFGGHQGGGLVGGLWRK), както и тяхната смес, се самоасоциират и образуват агрегати при определени концентрации. Флуоресцентните изследвания показват различия в динамиката на агрегиране между пептидите, като сместа (p1+p3) и p3 имат по-голяма склонност към агрегиране в сравнение с p1. Агрегирането е резултат от баланса на хидрофобни, електростатични и π - π взаимодействия между аминокиселинните остатъци. Конформационните промени при различни pH стойности показват различна динамика и стабилност на моно- и двукомпонентните разтвори. Антимикробните тестове срещу *E. coli* и *Bacillus subtilis* показват, че двукомпонентната смес (p1+p3) има по-висока инхибиторна активност в сравнение с отделните компоненти, което предполага адитивен или синергичен ефект.

Изследванията на протеините с антимикробно действие в слузта и хемолимфата на гастроподите представят нови данни за антибактериалния потенциал на протеинова фракция с молекулярна маса над 20 kDa от слуз на охлюва *Cornu aspersum*. Тази фракция показва висока активност срещу различни аеробни и анаеробни бактериални патогени. Показан е нов подход за характеризиране на протеини чрез електрофоретичен анализ, интерпретиран с ImageQuant™ TL v8.2.0 софтуер, който разкрива сложен профил, в който доминират протеини с МТ между 30 - 100 kDa. Протеомният анализ разкрива наличието на важни биоактивни протеини и гликопротеини: NADH дехидрогеназа, глутатион S-трансфераза, H-тип лектини, аглутинин, протеин с антимикробна активност, функционална единица на хемоцианин, L-аминокиселинна оксидаза, протеин FMRFamide, zinc finger протеин, еластин-подобен протеин, колагени и муцини. Много от тези протеини са свързани с антимикробни и антиоксидантни свойства. Хипотезата за синергично действие между различните компоненти на фракцията обяснява високата антибактериална активност срещу широк спектър патогени. Антибактериалната активност на фракцията е сравнима с тази на ванкомицин, без цитотоксични ефекти върху *Saccharomyces cerevisiae*. Методиката за идентифициране на протеини в слузта на *C. aspersum* може да бъде използвана за разработване на мултитаргетни терапевтици от природни източници, които да преодолееят антибиотичната резистентност.

Показана е антибактериална активност на протеинова фракция с молекулярна маса 50-100 kDa от хемолимфа на морския охлюв *Rapana venosa*. Тази фракция показва висока ефективност срещу *Escherichia coli* и нейната активност се дължи на комплексното взаимодействие на няколко типа протеини, включително пероксидазоподобен протеин, аплицианин А и L-аминокиселинна оксидаза. Изследванията също така показват значителна противогъбична активност на фракции от хемолимфата на *R. venosa* и слузта на *C. aspersum* срещу гъбични щамове, устойчиви на нистатин и амфотерицин. Това предполага възможността за използване на тези фракции като нови терапевтични агенти срещу гъбични инфекции.

II. Антитуморен потенциал на компоненти от хемолимфата и слузта на Гастроподи

Изследвани са различни изоформи и функционални единици на хемоцианини от няколко вида мекотели, както и фракции от хемолимфа и слуз на тези организми, за да се оцени тяхната антитуморна активност срещу различни ракови клетъчни линии. Установено е, че тези компоненти показват антипролиферативна активност, която може да бъде

свързана с индукция на апоптоза и автофагия в туморните клетки. Нови методи за изолиране и пречистване на хемоцианините са приложени, а резултатите показват, че специфичните олигозахаридни структури на повърхността на тези протеини играят ключова роля в антитуморната им активност.

Особено внимание е отделено на хемолимфата на морския охлюв *Rapana venosa*. Фракция с молекулна маса между 50-100 кДа (HRv 50–100 кДа) и две изоформи на хемоцианин (RvH1 и RvH2) показват обещаващ антитуморен потенциал срещу различни клетъчни линии на рак на гърдата. Тази фракция се оказва по-ефективна от изоформите на хемоцианина и води до клетъчна смърт чрез апоптоза и автофагия. Гликозилирането на протеините в тази фракция също играе важна роля за нейната антитуморна активност.

Чрез модерни методи като протеомен анализ, де ново секвениране и биоинформатика са идентифицирани протеини в активната фракция от хемолимфата на *R. venosa*, включително пероксидазо-подобни протеини, Aplysianin-A и L-аминокиселинна оксидаза. Тези протеини могат да обяснят антитуморния ефект и други биологични активности на фракцията. Комбинацията на HRv 50–100 кДа с цисплатина и/или тамоксифен показва синергични и адитивни ефекти, което подчертава терапевтичния потенциал на тази фракция при лечението на рак на гърдата. Тези изследвания разкриват нови възможности за използване на природни биоактивни съединения като противотуморни агенти, самостоятелно или в комбинация с конвенционални терапевтици.

Изследван е антитуморният потенциал на хемоцианини от морския охлюв *Rapana venosa* и сухоземния охлюв *Helix lucorum* върху клетъчна линия Т-24 на човешки карцином на пикочния мехур. Хемоцианините от гастроподите показват обещаващ имунологичен и селективен антитуморен потенциал. Резултатите показват, че структурната субединица RvHII и функционалните единици β -NH-h и RvHII-e демонстрират висок селективен цитотоксичен ефект върху пролиферацията на клетъчната линия Т-24 в сравнение с нормалната уротелна клетъчна линия HL 10/29. Третирането с N-гликозилираната функционална единица β -NH-h на *H. lucorum* хемоцианин показва най-висок антипролиферативен ефект, подобен на този на доксорубицина, като води предимно до апоптотични промени в туморните клетки. Хипотезата е, че специфичните въглехидратни епитопи на N-олигозахаридните структури на повърхността на функционалната единица β -NH-h са отговорни за наблюдаваните антитуморни ефекти.

III. Механизъм на действие на биокомпоненти от охлюви, установен чрез протеомен анализ на 2D-PAGE.

Изследването се фокусира върху механизма на антипролиферативно действие на функционалната единица β -NH-h на *H. lucorum* хемоцианин върху клетъчна линия Т-24 на човешки карцином на пикочния мехур чрез протеомен анализ. Чрез комплексен подход, включващ 2D-ПАГЕ и биоинформатика, са идентифицирани 40 протеина, чиято експресия се променя след третиране с β -NH-h. Тези протеини играят важна роля в гликолитичния път, лизозомните и протеазомните пътища на разграждане, както и в регулирането на компонентите на цитоскелета и извънклетъчния матрикс на раковите клетки. Сред тях са протеини, свързани с индуцирането на апоптоза, като HSP27, G3P, ANXA1, TPI, GAPDH и PKM2. Намалената регулация на тези протеини показва потенциал за нови стратегии в терапията на рак на пикочния мехур. Резултатите потвърждават проапоптозната активност на хемоцианите от мекотели и тяхното потенциално приложение в противораковата терапия.

Разгледан е механизмът на действие на стандартизиран екстракт от слюзта на охлюва *C. aspersum* върху животински модел на деменция от типа на Алцхаймер, индуцирана от скополамин. Екстрактът показва умерени антиоксидантни свойства и модулира съдържанието на моноамини в мозъчните структури, свързани с паметта. Протеомен анализ чрез 2D-PAGE и MALDI-TOF/MS анализи разкрива промени в експресията на ключови протеини в кортекса на плъхове, третирани с екстракта. Сред идентифицираните протеини са убиквитин карбоксил хидролаза изоензим, калбиндин, вакуоларна АТФ синтаза, тропомиозин, 14-3-3 зета/делта протеин, кинезин и статмин. Тези резултати подчертават потенциала на екстракта от слюзта на *C. aspersum* като терапевтична възможност за лечение на деменция от типа на Алцхаймер.

IV. Характеристика на други биоактивни компоненти от природни източници.

Открити са 17 нови пептида с молекулна маса под 1 kDa в хемолимфата на *H. lucorum* чрез *de novo* секвениране. Тези пептиди показват катионни амфипатични структури с хидрофобни повърхности, различни от тези в слюзта на *C. aspersum*. Основните аминокиселини в тези пептиди са Leu, Val, Phe, His, Pro, Lys и Tyr, което допринася за техния висок антиоксидантен потенциал, особено за улавяне на хидроксилни радикали.

Разработена е методика за изолиране, пречистване и характеризиране на циклолипопептиди от безклетъчни супернатанти на *B. velezensis R22* чрез LC-MS и LC-MS/MS анализ на UHPLC-Q-TOF система. Определени са основните активни съединения в екстракта от *B. velezensis R22*, включително сърфактини с молекулни маси 1035.698 Da и 1057.7 Da, и фенгицини с молекулни маси 1462.8 Da, 1476.8 Da, 1490.8 Da и 1504.8 Da. Техните първични структури също са охарактеризирани. Тези изследвания предоставят ценна информация за потенциалните приложения на биоактивни компоненти от природни източници в медицината и биотехнологиите.

Заклучение

Документите и материалите, представени от доц. д-р Людмила Георгиева Велкова за участие в конкурса за заемане на академичната длъжност „професор“ отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за неговото прилагане и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ИОХЦФ,БАН.

Доц. Велкова е представила достатъчен брой значими научни трудове и убедителни доказателства за своята научна и научно-приложна работа, илюстриращи високото качество на цялостната ѝ академична дейност. Всичко това ми позволява да дам положителна оценка и да препоръчам убедено на уважаемите членове на Научния съвет на ИОХЦФ,БАН да гласуват положително за избора на доц. д-р Людмила Георгиева Велкова на академичната длъжност „Професор“.

17.04.2025 г.

проф. д-р Мариела Оджакова