

Разширена хабилитационна справка за научните приноси на доц. д-р Людмила Велкова

*представена за участие в конкурс за академичната длъжност "професор",
професионално направление 4.2. Химически науки, научна специалност „Биоорганична
химия, химия на природните и физиологично активните вещества“, за нуждите на
лаборатория „Химия и биофизика на протеини и ензими (ХБПЕ)“*

В настоящата справка са представени най-съществените научни приноси от извършените изследвания след придобиване на академичната длъжност „доцент“. Те са представени в 72 публикации, от които 38 са извън конкурсите за придобиване на научна и образователна степен „доктор“ и за академичната длъжност „доцент“. В настоящия конкурс участвам с 6 публикации по индикатор В (Q1 - 5, Q2 - 1), 22 публикации по показател Г (Q1 - 5, Q2 - 6, Q3 - 8, Q4 - 3), 2 признати заявки за полезни модели и 265 цитата, които не са използвани в предишни конкурси, h-индекс (според Scopus) 12 (след изключване на автоцитатите на всички съавтори).

Всички научни трудове, представени за участие в конкурса, са в областта на биоорганичната химия, химия на природните и физиологично активните вещества. Една от основните тенденции в представените изследвания е откриването на нови, по-ефективни и селективни лекарствени молекули с естествен произход с антимикробен и антитуморен потенциал.

Основните обекти на изследванията са слюзта и хемолимфата на охлюви, които са сложни многокомпонентни физиологични смеси, включващи вещества с различни биохимични характеристики и свойства, с потенциални фармакологични приложения в борбата с микробните патогени, някои онкологични заболявания, а също и невродегенеративни заболявания.

Научният ми интерес е насочен главно към характеризиране на биологично-активни вещества от природни източници, като пептиди, протеини и гликопротеини в слюзта и хемолимфата на Гастроподи с антимикробна и антитуморна активност, с антиоксидантни и регенеративни свойства, изясняване на механизма им на действие и възможностите за тяхното приложение.

Представените в конкурса научни приноси са резултат от интердисциплинарни изследвания, които могат да бъдат обобщени в следните тематични направления:

I. Идентифициране и характеризиране на биокомпоненти от Гастроподи с атимикробна активност.

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

III. Механизъм на действие на биокомпоненти от охлюви, установен чрез протеомен анализ на 2-дименсионална гел електрофореза (2Д-ПАГЕ).

IV. Характеристика на други биоактивни компоненти от природни източници.

Посочените направления са насочени към важни предизвикателства в сектора на общественото здравеопазване и са приоритетни на редица национални стратегически документи като „Националната стратегия за развитие на научните изследвания в Република България 2017-2030 г.“, „Иновационната стратегия за интелигентна специализация“ и др.

Научните изследвания, свързани с разкриване на биологичната активност на биокомпоненти от природни източници, са проведени в сътрудничество с колективи от

национални институти и университети, участници в Националната научна програма „БиоАктивМед“ и в съвместни проекти с ФНИ.

Основните ми приноси са свързани с разработване на нови подходи за изолиране и характеризирание на активни компоненти в сложни многокомпонентни биологични смеси. Друг важен аспект от работата ми е свързан с изясняването на връзката между структура, функция и биологична активност, както и установяване на механизма на действие на активните компоненти.

Въведение

Антимикробната резистентност е една от най-сериозните заплахи за общественото здраве през 21 век, с важни социални и икономически последици. Наскоро, Световната здравна организация посочи нарастването на мултилекарствената резистентност на микроорганизмите като една от настоящите глобални заплахи за общественото здраве и обяви началото на „пост-антибиотична ера“.

Изследването и характеризирането на природни съединения с антимикробна активност е нова потенциална стратегия за намаляване на разпространението на антимикробната резистентност. В последните години, антимикробните пептиди (АМП) привличат вниманието на все повече изследователи поради широкоспектърното им антимикробно действие с висока специфичност, имуномодулиращи свойства и способността им да преодоляват конвенционалните механизми на резистентност. Те са открити в почти всички организми, вариращи от прокариоти до сложни еукариоти, включително и хора, и показват забележително структурно и функционално разнообразие. АМП са основни компоненти на вродената имунна защита на многоклетъчните организми. Доказано е, че за разлика от антибиотиките, те взаимодействат с множество цели върху плазмените мембрани на патогенните бактерии, както и вътреклетъчни цели и някои от тях проявяват мощна активност върху резистентни към лекарства бактерии. Тези взаимодействия могат да доведат до мембранна пермеабилзация, деполяризация, изтичане или лизис, водещи до клетъчна смърт. В този контекст АМП са обещаващ терапевтичен подход. Освен АМП, някои протеини и гликопротеини в слюзта и хемолимфата на гастроподи също проявяват антибактериални свойства и са важен компонент на вродения им имунен отговор.

Друга тенденция в съвременните изследвания е откриването на нови природни, селективни и по-ефективни противотуморни средства. В това отношение мед-съдържащи гликопротеини „хемоциани“, които функционират като преносители на кислород в хемолимфата на много Мекотели и Членестоноги, представляват значителен интерес, тъй като съчетават силна имуностимулираща активност, директен противораков ефект и селективност. От друга страна много протеини в хемолимфата на Мекотели и Гастроподи са все още неизвестни, ето защо тяхното изследване и характеризиране предизвиква висок научен интерес.

I. Идентифициране и характеризиране на биокомпоненти от Гастроподи с анти-микробна активност

Фокусът върху изследване на биокомпоненти от охлюви (безгръбначни организми, клас Гастроподи, тип Мекотели) е обоснован от голямото видово разнообразие и способността им да се адаптират към различни местообитания, което ги превръща в едни от най-големите източници на биоактивни съединения с антимикробна активност. Тези организми за разлика от гръбначните, нямат адаптивен имунен отговор и разчитат единствено на вродения си имунитет за противодействие на различни патогени. Техният еволюционен успех демонстрира ефективността на защитните им механизми.

I.1. Антимикробни пептиди от слюзта на градинския охлюв *Cornu aspersum*

Слюзта на сухоземните охлюви е сложна биологична субстанция, която не само улеснява придвижването, размножаването и подпомага копулацията им, но и ги предпазва от бактериални инфекции и наранявания, като стимулира бързата регенерация. През последното десетилетие няколко проучвания съобщават за антибактериални и антиоксидантни свойства, както и за лечебния потенциал на слюзта на някои сухоземни охлюви при лечение на рани (*Lissachatina fulica* наричан още *Achatina fulica*, *Archachatina marginata saturalis*, *Archachatina marginata ovum* и *Achatina achatina* от семейство Achatinidae, *Cryptozona bistrialis*, *Hemiplecta differenta*, *Eremina desertorum*, *Helix lucorum* и *Helix aspersa* (наречен още *Cornu aspersum*).

Към днешна дата проучванията, свързани с идентифицирането на АМП в слюзта на сухоземни охлюви са твърде оскъдни и повечето от тях са фокусирани върху сухоземния охлюв *A. fulica* – предимно хомоложни форми на антимикробния пептид митимацин-AF с МТ 9.7 кДа и с МТ 11.45 кДа, както и пептиди, включващи от 5 до 25 аминокиселинни остатъка (АКО) с предполагаема антиракова активност.

Основните ми научни приноси в представените мултидисциплинарни изследвания са свързани с изолиране и характеризиране на различни фракции от слюзта на *C. aspersum*, масспектрометрични анализи и интерпретиране на получените резултати, разработване на методология въз основа на биоинформативен подход за изясняване на връзката между структура и антимикробна активност, изграждане и доказване на хипотези. Разкрит е потенциала на пептидните фракции от слюзта на *C. aspersum*, като източник на нови антибактериални агенти, което е от особено значение в контекста на нарастващата антибиотична резистентност за разработване на алтернативни терапии.

- За първи път е доказан антибактериалния потенциал на 5 пептидни фракции (с МТ < 3 кДа, МТ 3-5 кДа, МТ 5-10 кДа, МТ < 10 кДа, и МТ < 20 кДа), получени чрез ултрафилтрация на пречистен екстракт от слюзта на градинския охлюв *C. aspersum*, срещу редица Грам⁺ и Грам⁻ бактерии [B1; B5; Г12]. Установено е, че фракция с МТ < 10 кДа показва обещаваща антибактериална активност срещу *Escherichia coli* NBIMCC 8785 [B1; Г12], а фракцията с МТ под 20 кДа демонстрира най-широк спектър от антибактериални свойства срещу *Bacillus cereus* 1085, *Propionibacterium acnes* 1897, *Salmonella enterica* 8691, *Enterococcus faecalis* 3915, *Enterococcus faecium* 8754 [B5], *Pseudomonas aureofaciens* [B1], както и срещу резистентни към нистатин и амфотерицин гъбични щамове [Г22].

- Молекулните маси на съединенията в пептидната фракция с МТ < 20 кДа са идентифицирани чрез масспектрометрични анализи, след пречистване с високоефективна течна хроматография (RP-HPLC) [B5]. Открити са множество пептиди, представени като молекулни протонирани йони [M+H]⁺ при m/z под 3 кДа [B1; B5; Г13], както и няколко пептида с по-високи молекулни маси между 4 - 8 кДа [Г12] и полипептиди с МТ между 10 и 20 кДа [B5]. Определените компоненти с МТ между 10 - 20 кДа са в добро съответствие с по-рано идентифицираните лектини и полипептиди с антибактериална активност в слюзта на охлювите *A. fulica*, *Helix pomatia* и *Helix aspersa* [B5]. Освен посочените пептиди, съставът на фракцията с МТ < 20 кДа включва още и вторични метаболити като аминокиселини, алантоин, гликолова киселина, трипептида глутатион (γGSH) и антиоксидантни пептиди с МТ под 1 кДа, доказани чрез масспектрометричен анализ и ¹H-ЯМР спектроскопия [Г1].

- 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 [B1; B5; Г12; Г13]. Характеризирането на пептидите чрез физикохимичните им параметри като молекулна маса, изоелектрични точки (pIs), голяма средна стойност на хидропатичност (GRAVY) и нетен заряд, разкрива богато разнообразие от амфипатични структури - катионни,

анионни, и неутрални, предимно с хидрофобни повърхности, което е от съществено значение за тяхната селективност и антибактериална активност [B1; B5; Г13]. Структурните характеристики на пептидите показват високи нива на аминокиселинните остатъци – глицин (Gly), левцин (Leu), валин (Val), пролин (Pro), триптофан (Trp), лизин (Lys), аспарагинова киселина (Asp), фенилаланин (Phe) и аргинин (Arg), характерни за АМП [B5].

- Доказано е, че идентифицираните пептиди в слюзта на *C. aspersum* принадлежат към семейство АМП. Подравняването на аминокиселинните им последователности с база данни за АМП - CAMPSing (<http://www.campsign.bicnirrh.res.in/blast.php>) и UniProtKB/Swiss-Prot с BLAST алгоритъм (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) разкрива висока хомология (над 70%) 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. [B5; B1; Г12].

- Прогнозирането на антимикробната активност на новооткритите пептиди чрез софтуера iAMPpred (<http://cabgrid.res.in:8080/amppred>) [B5; Г12; Г13] доведе до идентифициране на редица пептидни структури с обещаваща (над 70%) прогностична антибактериална и противогъбична активност, както и няколко структури с антивирусна активност, които могат да послужат като модел за проектиране на нови антимикробни терапевтици [B1; B5; Г12].

- Въз основа на разработената методология за характеризиране на пептиди от слюзта на *C. aspersum* е получена важна, фундаментална информация относно техния потенциал като нови антимикробни средства за биомедицински приложения [B5].

- Защитен е полезен модел [[Г(1)] за състав с обещаващо антибактериално действие срещу *Pseudomonas aureofaciens* AP9, *Brevibacillus laterosporus* BT271 и *Escherichia coli* NBIMCC 878, включващ пептидна фракция с МТ под 10 кДа и въглеродни наночастици.

I.1.1. *In silico* и физико-химично характеризиране на динамиката на образуване на клъстери в разтвори на пептиди от слюзта на *C. aspersum*

В последните години, някои изследователи застъпват хипотезата относно феноменът на самоасоциирането и агрегацията на клетъчно проникващите пептиди, което е от важно значение за биологичната им активност. Все още, ролята на олигомерните пептидни структури за активността и селективността на АМП не е широко проучена, а резултатите от експериментални и теоретични изследвания през последните години по тази тема са изключително противоречиви.

- Богатото разнообразие на катионни, анионни и неутрални пептиди с МТ под 3 кДа, открити в слюзта на *C. aspersum*, е предпоставка за спонтанно взаимодействие между тях и образуването на олигомерни структури преди целевото взаимодействие с бактериалната мембрана [(B4)]. Въз основа на резултати от *in silico* симулации на молекулярна динамика е предложена хипотеза за спонтанното образуване на пептидни наноструктури (клъстери) в слюзта на *C. aspersum*.

- Валидирането на тази хипотеза е постигнато експериментално чрез разработената методология, основана на UV-Vis спектроскопски и флуоресцентни изследвания и *in vitro* тестове на антибактериалната активност на два пептида: p1 (KVKDNQWRP) и p3 (LFGGHQGGGLVGGGLWRK) и тяхната двукомпонентна смес [B4 (раздел 3.4.)]. Фокусът върху тези пептиди е мотивиран от тяхната катионна природа, наличието на Trp, който е от съществено значение за антибактериалната активност, и значителните разлики в дължината на полипептидната верига и молекулната маса, разпределението на заряда и хидрофобното съдържание.

- Проследяването на зависимостта на UV-абсорбцията от концентрацията на двата пептида и тяхната смес, изследвани при идентични условия в диапазон от 0.25 мг/мл до 10.0 мг/мл, потвърждава процеса на самоасоцииране на пептидите в монокомпонентни и двукомпонентни разтвори, и показва праговите концентрации, при които започва процеса на олигомеризация. Резултатите от сравнителното изследване на флуоресцентната емисия на p1, p3 и (p1+p3), също са в потвърждение на възможността за самоасоцииране на пептидите в олигомерни структури, но с различна динамика на агрегиране [B4 (раздел 3.5.)]. По този начин експериментално е потвърдено, че пептидната смес (p1+p3) и p3 има по-висока склонност към образуване на агрегати в сравнение с p1, което е в съответствие с разпределението на зарядите и хидрофобните аминокиселинни остатъци в полипептидните вериги [B4].

- Показано е, че процесът на агрегиране е резултат от баланса на различните взаимодействия между аминокиселинните остатъци в пептидните конформации, свързани предимно с хидрофобния ефект, електростатичните взаимодействия и π - π взаимодействия на ароматни остатъци [B4]. Проследяването на конформационните промени при идентични условия в широк pH диапазон (3.0-12.0) показва различна динамика на агрегиране и стабилност на моно- и дву- компонентните разтвори [B4].

- Друго потвърждение на хипотезата са резултатите от проведените антимикробни тестове срещу *E. coli* 3458 (Грам⁻) и *Bacillus subtilis* (Грам⁺) на едно- и дву-компонентни пептидни смеси. Установено е над 50% инхибиране на растежа на *E. coli* 3458 от двукомпонентната смес (p1+p3) при най-ниската изследвана концентрация (0.1 мг/мл), което надвишава с 20%, респ. 75% инхибирането, постигнато от отделните компоненти (p3, респективно p1). Тези резултати са в съответствие с адитивен или дори синергичен ефект в този диапазон на концентрация, което е в съответствие с изказани по-рано хипотези [B5; B1; Г12].

- В резултат на комбиниране на различни подходи и методи (като *in silico* изследвания, спектроскопски анализи и *in vitro* антибактериални тестове) е получена важна информация за сложната връзка между разпределението на пептидния заряд, хидрофобния състав, концентрацията, моделите на агрегиране и биологичната активност на пептидите от слюзта на *C. aspersum* [B4]. Резултатите от експериментално потвърдените процеси на самоасоцииране са в пълно съответствие с моделите и скоростта, предсказани от изчислителното моделиране. Наблюдаваните зависимости, от състава и концентрацията на пробите, подкрепят концепцията за критични прагове на концентрацията и изключително сложен механизъм на биологичната активност на природните вещества [B4].

I.2. Протеини с антимикробно действие в слюзта и хемолимфата на Гастроподи

Основните ми научни приноси в тези интердисциплинарни изследвания са свързани с разработване на методология за изясняване на протеиновия профил на фракции от слюзта и хемолимфата на Гастроподи, въз основа на електрофоретични изследвания, интерпретирани чрез софтуера ImageQuantTM TL v8.2.0, анализ на резултатите от масспектрометричните изследвания, обобщаване на информация от различни бази данни за Гастроподи и Мекотели и изграждане на хипотези.

I.2.1 Антибактериален потенциал на протеинова фракция от слюзта на *C. aspersum*

За първи път е получена информация за висок антибактериален потенциал на протеинова фракция с МТ > 20 кДа от слюзта на *C. aspersum* срещу редица аеробни бактериални патогени - *Bacillus cereus* 1085, *Propionibacterium acnes* 1897, *Salmonella enterica* 8691, *Enterococcus faecalis* 3915, *Enterococcus faecium* 8754 [B5], *Pseudomonas aureofaciens* и анаеробната, спорообразуваща бактерия *Clostridium perfringens* [B1].

- Показаният нов подход за характеризиране на протеини в слюзта на *C. aspersum* чрез електрофоретичен анализ, интерпретиран с ImageQuant™ TL v8.2.0 софтуер, разкрива сложен протеинов профил, в който доминират протеини с МТ между 30 - 100 кДа [B5]. Изградена е хипотеза за протеиновия състав на активната фракция, въз основа на съответствие с базата данни UniProt за протеини в Мекотели и Гастроподи, както и публикувани данни за протеини, съдържащи се в слюзта на други охлюви - *A. fulica* и *Helix lucorum* [B5].

- Предоставена е нова фундаментална информация за важни биоактивни протеини и гликопротеини в състава на фракция с МТ > 20 кДа от слюзта на *C. aspersum*, на базата на електрофоретичния профил, анализиран с ImageQuant™ TL v8.2.0 софтуер и протеомен анализ, включващ масспектометрични анализи и биоинформатика [B5]. Определянето на протеините в активната фракция с МТ > 20 кДа от слюзта на *C. aspersum* е постигнато чрез идентифицирането на първичните структури на екстрахираните пептиди от всяка протеинова лента (след протеолитична хидролиза с трипсин) и сравняване на получените аминокиселинни последователности (АКП) с базата данни non-redundant protein sequences (nr) и UniProtKB/Swiss-Prot за извънклетъчни протеини в Гастроподи чрез BLAST алгоритъм. Повечето от АКП демонстрират идентичност над 60% и Е-стойности между 1×10^{-13} и 1, което показва голяма вероятност протеините да имат общ еволюционен произход. По този начин е установена висока хомология с редица протеини и гликопротеини, като NADH дехидрогеназа [от *Albinaria caerulea*]; глутатион S-трансфераза [от *P. canaliculata*]; Н-тип лектини, включително аглутинин; протеин с антимикробна активност с МТ 39.115 кДа [QEG59312 от *C. aspersum*]; функционална единица β C-d на *C. aspersum* хемоцианин; L-аминокиселинна оксидаза подобен протеин (като Ахацин от *L. fulica*); протеин FMRFamide активиращ амилорид-чувствителен натриев канал [*C. aspersum*]; zinc finger протеин [*Biomphalaria glabrata*]; еластин-подобен протеин; няколко вида колаген (колаген алфа-1, колаген α -4 и колаген алфа-6) и муцини (муцин-5AC-, муцин-5B-, муцин-2 и муцин-17-подобен протеин) [B5 (раздели 2.2. и 3.)].

- Повечето от откритите протеини могат да бъдат свързани с показаните антимикробни и антиоксидантни свойства на тази фракция. Някои от тях, като протеини с L-аминокиселинна оксидазна активност (открити в диапазона 56.94–59.04 кДа) са определени за първи път в слюзта на *C. aspersum* [B5]. Подобни протеини досега са открити в слюзта само на няколко вида сухоземни охлюви от семейство Achatinidae [B5].

- Изложена е хипотеза за синергия между компоненти в състава на активната фракция с МТ > 20 кДа (като потвърдения антимикробен протеин, наречен Аспернин, функционални единици на N-гликозилиран *C. aspersum* хемоцианин, С- и Н-лектини, протеин с L-аминокиселинна оксидазна активност и няколко вида муцини), отговорни за високия антибактериален ефект срещу широк спектър Грам⁺ и Грам⁻ патогени [B5 (раздел 3.)].

- Доказано е, че антибактериалната активност на протеиновата фракция (в концентрации между 32 и 128 μ г/мл) е сравнима с антибиотичната активност на ванкомицин, но без цитотоксични ефекти върху моделни еукариотни клетки на *Saccharomyces cerevisiae*. Изследванията, свързани с цитотоксичността на фракция с МТ > 20 кДа върху *S. cerevisiae*, разкриват не само липса на цитотоксичност, но увеличаване на антиоксидантния капацитет и намаляване на нивата на вътреклетъчно окислително увреждане, което е обвързано с уникалния състав на тази фракция [B5].

- Разработената методика за идентифициране на протеини в слюзта на *C. aspersum* може да послужи за основа на други проучвания за разработване на мултицелствени терапевтици от природни източници, способни да преодолеят развитието на антибиотична резистентност. [B5].

I.2.2. Антибактериален потенциал на протеинова фракция, изолирана от хемолимфата на морския охлюв *Rapana venosa*

Изолирана е фракция с МТ 50-100 кДа от хемолимфата на морския охлюв *R. venosa*, която проявява висока антибактериална активност срещу *E. coli* NBIMCC 8785 [Г19]. Основните приноси в това изследване са:

- Определени са молекулните маси на 3 основни типа протеини при 93.088 кДа, 62.100 кДа и 50.230 кДа, след използване на нов подход за характеризиране на компонентите във фракции от хемолимфата на морския охлюв *R. venosa*, въз основа на електрофоретичния профил на фракцията, интерпретиран с ImageQuantTM TL v8.2.0 софтуер. Изградена е хипотеза за вероятните протеини, отговорни за антибактериалната активност, въз основа на обобщаване на данните за извънклетъчни протеини в хемолимфата на Гастроподи в база данни UniProt [Г19], като три от тях са потвърдени чрез протеомен анализ [Г19; В3].

- Показано е, че 50% концентрация на фракцията с MW 50–100 kDa е в състояние да елиминира 99% от живите бактерии *E. coli* NBIMCC 8785, а използването на само 1% концентрация на активната фракция, води до намалена метаболитната активност и 24% намален размер на бактериалните клетки. Показано е, че фракцията Rv 50-100 кДа има по-силно изразено действие в сравнение с пептидната фракция с МТ<10 кДа от слузта на *C. aspersum*, която убива до 60% от *E. coli* NBIMCC 8785 при 50% концентрация, но не е ефективна при 1% концентрация.

- Изказана е хипотеза, че високата антибактериална активност на фракцията от хемолимфата на *R. venosa* се дължи на сложното взаимодействие на три основни типа протеини, хомоложни на пероксидазоподобен протеин (открит при 93.088 кДа), аплицианин А и L-амино киселинна оксидаза (при 62.100 кДа) и функционални единици с МТ ~50 кДа на *R. venosa* хемоцианин, които демонстрират различни механизми на бактерицидно и/или бактериостатично действие [Г19 (раздел 3.)].

- Получените резултати доказват високия антибактериален потенциал на фракция Rv 50–100 кДа, като подходящ компонент на терапевтични средства за третиране на инфекции причинени от *E. coli*, способен да избегне развитието на антибиотична резистентност [Г19].

I.1.3. Антигъбична активност на фракции от хемолимфата на морски охлюв *R. venosa* и слузта на градински охлюв *C. aspersum*

За първи път е оценена противогъбичната активност на две фракции от гастроподи срещу гъбични щамове, резистентни към нистатин и амфотерицин. Резултатите показват значителен фунгициден ефект на двете изследвани фракции срещу *Aspergillus niger* и *Penicillium griseofulvum*, който корелира с повишени нива на биомаркери за оксидативен стрес [Г22].

- Пептидната фракция (MCa/1-20) от слузта на *C. aspersum* и протеиновата фракция (HLRv/3-100) от хемолимфата на морския охлюв *R. venosa* са получени чрез неинвазивна методика на базата на ултрафилтрация на пречистени нативни екстракти. Въпреки, че двете фракции показват сходна противогъбична активност, те са напълно различни по състав [Г22].

- Изложена е хипотеза за състава на компонентите в активната фракция HLRv/3-100, въз основа на интерпретирания електрофоретичен профил на HLRv/3-100, чрез софтуера ImageQuantTM TL v8.2.0 и обобщените резултати от проведеното търсене в базата данни UniProt за протеини, локализирани извънклетъчно в Гастроподи и Мекотели и предходни изследвания [Г22 (раздел 3.1.)]. Протеините с МТ 37.851 кДа са в добро съответствие с извънклетъчния протеин катепсин-L ендопептидаза и/или катепсин L-подобна цистеин протеиназа (идентифицирани в хемолимфата на няколко вида аболони от род *Haliotis*), които

играят важна роля във вродената имунна защита на безгръбначните организми; протеините с МТ между 17 – 30 кДа най-вероятно включват С- и Н-тип лектини и галектини, открити в хемолимфата на различни гастроподи, мекотели и морски членестоноги; а протеините при 93.765 кДа, 62.601 кДа и 49.950 кДа са идентифицирани в предходни изследвания чрез протеомен анализ [Г22 (раздел 3.1.)]. Повечето от предложените протеини са мултифункционални и играят изключително важна роля във вродената имунна система на Гастроподи и Мекотели за защита срещу нахлуващите микроорганизми, посредством различни механизми на действие като фагоцитоза, клетъчно капсулиране и аглутинация и др. [Г22 (раздел 3.1.)]. Изградена е хипотеза за синергията между биоактивните съединения в хемолимфата, която е отговорна за наблюдаваната противогъбична активност [Г22].

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

Показан е високия потенциал на различни изоформи и някои функционални единици на хемоциани от *H. lucorum* (HlH), *H. aspersa* (HaH) и *R. venosa* (RvH), както и фракции от хемолимфата на *R. venosa* с МТ 10-50 кДа и 50-100 кДа и фракции от слюзта на *C. aspersum* с МТ над 20 кДа и с МТ над 50 кДа, срещу ракови клетъчни линии с разнообразен произход и различни генетични профили (клетъчната линия на човешки колоректален карцином HT-29, клетъчни линии на рак на пикочния мехур CAL-29 и T-24, клетъчни линии на рак на гърдата, рак на белия дроб A549 и H1299 и др.) [Г2; В2; Г14; В3; Г18]. Установено е, че антипролиферативната активност на тестваните хемоцианини и фракции е свързана предимно с индукция на апоптотични и в по-малка степен на късни апоптотични или некротични промени в туморните клетки, а в някои случаи и с индукция на автофагия [Г2; 5В2; Г14; В3; Г18], което подчертава предимствата им за повлияване на резистентни неопластични процеси.

- Приложени са нови подходи, включващи комбинации от различни методи за оптимизиране изолирането и пречистването на нативните хемоцианини и техните изоформи [Г2; В2; Г14; Г18]. Изолираните хемоцианини и фракции от слюзта и хемолимфата са характеризирани чрез електрофоретични и MALDI-TOF/MS анализи.

- Изказана е хипотеза, че установените антипролиферативни промени в туморните клетки след третиране с различни форми на хемоциани са свързани предимно със специфичните олигозахаридни структури, разположени на повърхостта на функционалните и структурните субединици на хемоцианините [Г2; Г14].

- Антитуморната активност на фракциите от слюзта на *C. aspersum* и хемолимфата на *R. venosa*, вероятно се дължи на сложно взаимодействие между протеини с различни функции, които могат да предизвикат клетъчна смърт чрез различни механизми на действие [В3; Г18].

II. 1. Антитуморен потенциал на компоненти от хемолимфата на *Rapana venosa*

Ракът на гърдата е най-често срещания рак при жените и вторият най-често срещан рак с висока заболяемост и смъртност. Основните причини за тази тревожна статистика са свързани с неговата висока молекулна хетерогенност с множество подтипове, водещи до значителни вариации по време на заболяването, висок риск от метастази, рецидиви и прогресия. От друга страна, използването на конвенционалните терапии много често е съпроводено с нежелани странични ефекти, неефективно индуциране на клетъчна смърт в туморните тъкани и развитие на лекарствена резистентност.

За първи път е изследван антитуморния потенциал на биоактивни компоненти от хемолимфата на *R. venosa* в сравнение с цис-платина и тамоксифен срещу панел от клетъчни линии на рак на гърдата [В3].

- Установена е обещаваща антитуморна активност на биологично активни съединения, изолирани от хемолимфата на морски охлюв *R. venosa* – фракция с МТ между 50-100 кДа (HRv 50–100 кДа) и двете изоформи на хемоцианин (RvH1 и RvH2), срещу шест линии от различни молекулярни подтипове на рак на гърдата MDA-MB-231, MDA-MB-468, BT-474, BT-549, SK-BR-3 и MCF-7 и една неракова MCF-10A линия. Показано е че, фракция HRv 50–100 кДа се отличава с най-висок антитуморен потенциал, дори по-висок от изоформите на хемоциана (RvH1 и RvH2), засягайки клетъчната жизнеспособност, морфологията на раковите клетки и активирането на автофагия [B3].

- Гликозилирането на протеините има важно значение при разработването на нови антиракови терапии. Доказан е гликозилирания характер на протеините във фракция HRv 50–100 кДа и е потвърдена по-високата степен на гликозилиране на RvH1 в сравнение с RvH2, чрез проведения скрининг тест с орцинол/H₂SO₄ [B3].

- Въз основа на съчетаване на три съвременни подхода - протеомен анализ на 1Д-ПАГЕ, *de novo* секвениране (MALDI-MS/MS) и биоинформатика, за първи път са идентифицира протеините в активната фракция от хемолимфата на *R. venosa* [B3]. След изрязване на протеиновите ленти от гела, последвано от обезцветяване, редуциране, алкилиране и разграждане с трипсин, екстрахираните пептиди са анализирани масспектрометрично. Използвани са два подхода:

- Първият подход включва определяне на молекулните маси на пептидите, екстрахирани от всяка протеинова ивица, чрез MALDI-MS и интерпретирането им с Mascot Peptide Mass Fingerprint в база данни SwissProt. Този подход, обаче не доведе до идентифициране на протеините, тъй като информацията в базата данни за извънклетъчни протеини в Мекотели е все още недостатъчна [B3].

- Втори подход. Идентифицирането на целевите протеини е постигнато чрез *de novo* секвениране, определяне на първичната структура на екстрахираните пептиди от всяка протеинова лента и сравняване на АКП с база данни UniProtKB/SwissProt за Мекотели чрез BLAST алгоритъм. Установена е висока хомология с пероксидазо-подобни протеини в хемолимфата на *Lottia gigantea* (при ~97 кДа), Aplysianin-A и L-аминокиселинна оксидаза открити в *Aplysia kurodai* и *Aplysia californica* (при ~62 кДа), както и функционални единици на хемоцианини с МТ ~50 кДа. Представените АКП демонстрират над 60% идентичност и Е-стойности между 1×10^{-4} и 1, което предполага по-голяма вероятност последователностите да имат общ еволюционен произход [B3].

- Откриването на пероксидазо-подобен протеин при ~97 кДа, Aplysianin-A и L-аминокиселинна оксидаза при ~62 кДа имат фундаментално значение, тъй като до този момент в хемолимфата на *R. venosa* са идентифицирани само някои функционални единици на хемоциан *R. venosa*, актин и богати на пролин антимикробни пептиди с МТ под 10 кДа. Биологичните функции на определените протеини могат да обяснят не само антитуморния ефект срещу панел от човешки клетъчни линии на рак на гърдата [B3], но и установената висока антибактериална активност срещу *E. coli* NBIMCC 8785 [Г19] и антиоксидантните свойства на тази фракция [Г21].

- Изказана е хипотезата, че антитуморния ефект се дължи на синергията между N-гликозилираните протеини в тази фракция, с доказан висок антитуморен потенциал, като протеини с L-АКО активност (L-аминокиселинна оксидаза и Aplysianin-A) и функционални единици от RvH с МТ ~50 кДа, които могат да предизвикат клетъчна смърт чрез различни механизми на действие [B3]. Наблюдаваната селективна цитотоксичност и потенциалното участие на пътищата на апоптоза и автофагия подчертават терапевтичния потенциал на тази фракция при лечението на рак на гърдата [B3].

- За първи път е установено, че комбинацията от HRv 50–100 с цисплатина и/или тамоксифен демонстрира значителни синергични и адитивни ефекти върху всички тествани клетъчни линии. Доказано е, че комбинирано действие на фракция Rv50-100 кДа и цисплатина е три пъти по-ефективно в сравнение с третирането само с класическия химиотерапевтик върху две клетъчни линии MDA-MB-231 и BT-549, с висок метастатичен потенциал и риск от развитие на лекарствена резистентност [B3].

- Използваните подходи разкриват нови перспективи за приложението на природни биоактивни съединения, като противотуморни агенти, използвани самостоятелно или като бустер в комбинация с конвенционални терапевтици при онкологични заболявания [B3].

II. 2. Изследване на антитуморния потенциал на хемоцианини от *Rapana venosa* и *Helix lucorum* върху клетъчна линия T-24 на човешки карцином на пикочния мехур

Високомолекулната хетерогенност на туморите на пикочния мехур е отговорна за значителни вариации по време на заболяването, както и за високите нива на рецидиви и прогресия, което затруднява въвеждането на нови терапевтични агенти. Откриването на селективни и по-ефективни терапевтици за това заболяване е едно от най-големите предизвикателства за фармакологията и онкологията. Някои хемоцианини от Гастроподи имат значителен имунологичен и селективен антитуморен потенциал, което е предпоставка за тяхното приложение в онкологията.

- Изследвано е антитуморното действие на различни форми на хемоцианини от *R. venosa* и *H. lucorum* в сравнение с KLN и доксорубицин. Установен е висок селективен цитотоксичен ефект на структурната субединица RvHII и две функционални единици β c-HII-h и RvHII-e върху пролиферацията на клетъчна линия T-24 на човешки карцином на пикочния мехур в сравнение с нормална уротелна клетъчна линия HL 10/29 [B2].

- Показано е, че третирането с N-гликозилираната функционална единица β c-HII-h на *H. lucorum* хемоцианин демонстрира най-висок антипролиферативен ефект (подобен на доксорубицина) и води предимно до апоптотични и в по-малка степен до късни апоптотични или некротични промени в туморните клетки [B2]. Изказана е хипотеза, че специфичните въглехидратните епитопи на N-олигозахаридните структури, разположени на повърхността на функционална единица β c-HII-h са отговорни за наблюдавания антитуморен ефект [B2].

III. Механизъм на действие на биокомпоненти от охлюви, установен чрез протеомен анализ на 2-дименсионална гел електрофореза (2Д-ПАГЕ)

III. 1. Изследване механизма на действие на β c-HII-h чрез протеомен анализ върху клетъчна линия T-24 на човешки карцином на пикочния мехур

- Механизмът на антипролиферативно действие на функционална единица β c-HII-h на *H. lucorum* хемоцианин върху клетъчна линия T-24 на човешки карцином на пикочния мехур е изследван за първи път чрез протеомен анализ [B2].

- Въз основа на приложения комплексен подход, включващ протеомен анализ на 2Д-ПАГЕ и биоинформатика са идентифицирани 40 протеина в T-24 клетъчна линия на човешки карцином на пикочния мехур, които променят експресията си след третиране с β c-HII-h [B2]. Повечето от тях играят важна роля в гликолитичния път, лизозомните и протеазомните пътища на разграждане и регулират компонентите на цитоскелета и извънклетъчния матрикс на раковите клетки [B2].

- Идентифицирането на протеините е постигнато въз основа на MALDI-TOF/MS анализи на пептиди (екстрахирани от протеиновите петна след проведена трипсинолиза), интерпретирани с Mascot Peptide Mass Fingerprint. Девет протеина, свързани с индуцирането

на апоптоза в туморните клетки, са допълнително потвърдени от аминокиселинните им последователности, идентифицирани чрез MALDI-TOF/MS/MS анализи [B2].

- Установена е намалена регулация на ключови протеини, свързани с пролиферацията на клетъчна линия Т-24 на карцином на пикочния мехур, като протеин на топлинен шок Hsp27, глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа (G3P), анексин А1 (ANXA1), триозофосфат изомераза (TPI), глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа (GAPDH), пируват киназа М2 (PKM2) и др. Инхибирането на някои протеини, като анти-апоптотичния протеин на топлинен шок HSP27, както и на GAPDH и PKM2 (свързани с енергийния метаболизъм и сигналите пътища в раковия метаболизъм), е показано като нова стратегия в терапията на рак на пикочния мехур. Промяната в нивата на TPI в урината може да бъде използвано като маркер за проследяване хода на забавянето [B2].

- Показаните резултати потвърждават и допълват публикуваните данни за значителната проапоптозна активност на хемоцианите от мекотели срещу различни туморни клетъчни линии, което е предпоставка за потенциалното им приложение в противораковата терапия [B2].

III. 2. Изследване на механизма на действие на екстракт от слюзта на *C. aspersum* върху животински модел на деменция от типа на Алцхаймер, индуцирана от скополамин

В търсенето на нови терапевтични стратегии за намаляване на симптомите и забавяне на прогресията на невродегенеративните заболявания водеща роля има многоцелевия подход. В основата на този подход е концепцията за използване на вещества, които засягат различни молекулни структури като фармакологични цели. Основен източник на такива многофункционални агенти са природните компоненти от различни източници.

За първи път е предоставена информация за капацитета на стандартизиран екстракт от слюзта на охлюви *C. aspersum*, който подобрява паметта и когнитивните способности при индуцирана от скополамин деменция от типа на Алцхаймер при плъхове [Г16]. Установено е, че екстрактът от слюзта проявява умерени антиоксидантни свойства и модулира съдържанието на моноамини в мозъчните структури, свързани с паметта [Г16]. Показано е, че някои вторични метаболити, осмолити, бетаин, холин, алантоин, глутатион и някои пептиди и протеини, свързани с антиоксидантните и антимикробни свойства на слюзта са отговорни за установения ефект. Защитен е полезен модел [Г(2)] за състав с благоприятно повлияване на деменция от Алцхаймеров тип, включващ биоактивен екстракт от слюзта на градински охлюв *H. aspersa* като основен компонент.

- За първи път е изследван механизма на превантивното действие на стандартизиран екстракт от слюзта на *C. aspersum* (ЕС), обогатен с фракция с МТ над 20 кДа, върху деменция от типа на Алцхаймер при плъхове чрез протеомен анализ на 2Д-гел електрофореза (2Д-ПАГЕ). Сравнена е протеиновата експресия в хомогенат от кортекса на двете групи животни: първата - третирана интраперитонеално със скополамин (Ско, 2 мг/кг, 11 дни), а втората група (Ско + ЕС), третирана също интраперитонеално със Ско (Ско, 2 мг/кг) и защитена с екстракт от слюзта на охлюв (0.5 мл/100 г телесно тегло), прилаган перорално ежедневно в продължение на 11 дни [B6].

- Получена е нова информация за промените в експресията на протеините в кортекса на плъхове въз основа на 2Д-ПАГЕ, анализирана чрез MelanieTM Coverage 9 софтуер. Установено е добро съответствие между експериментално определените pI и МТ на протеините и информацията в база данни UniProt за протеини в мозъка на плъхове [B6].

- Идентифицирането на редица протеини с променена регулация е постигнато въз основа на MALDI-TOF/MS анализи на пептиди (екстрахирани от гела след трипсинолиза на

изрязаните протеинови петна), сравнени чрез MASCOT софтуер с теоретични молекулни маси, генерирани в Mascot database-Fingerprint (<http://www.matrixscience.com/>). Осем ключови протеина са допълнително потвърдени от аминокиселинните им последователности, определени чрез MALDI-MS/MS анализи [B6].

- Използвайки този комплексен подход са определени редица протеини, свързани с паметта и когнитивните функции. Получена е обобщена информация за биологичните функции (структурни, регулаторни, метаболитни, сигнални и др.) на протеините, идентифицирани в кортекса на плъхове и тяхното участие в различни аспекти на прогресията на болестта на Алцхаймер [B6].

- За първи път, въз основа на протеомен анализ, е показана значителна промяна в протеиновата експресия на убиквитин карбоксил хидролаза изоензим, калбиндин, вакуоларна АТФ синтаза, тропомиозин, 14-3-3 зета/делта протеин, кинезин и статмин в кортекса на плъхове, превантивно третирани с екстракт от слюзта на *C. aspersum* в сравнение с дементни животни, третирани само със скополамин, което очертава тези протеини като потенциални терапевтични цели за лечение на деменция от типа на Алцхаймер [B6].

IV. Характеризиране на други биоактивни компоненти от природни източници

IV.1. Антиоксидантни свойства на пептиди и вторични метаболити от хемолимфата на градински охлюв *H. lucorum*

- Установени са първичните структури на 17 нови пептида във фракцията с МТ под 1 кДа от хемолимфата на градински охлюв *H. lucorum* с потенциална антиоксидантна активност въз основа на *de novo* секвениране [Г4; Г9]. Характеризирането на пептидите показва предимно катиони амфипатични структури с хидрофобни повърхности, които се различават значително от пептидите с потенциални антиоксидантни свойства открити в слюзта на *C. aspersum* [Г7; Г1; Г15].

- Установеният антиоксидантен потенциал на фракцията с МТ под 1 кДа, от хемолимфата на *H. lucorum*, се обуславя главно от пептиди с ниската молекулна маса и специфични аминокиселинни последователности, включващи предимно Leu, Val, Phe, His, Pro, Lys и Туг остатъци. Получените резултати потвърждават, че по-високият дял на хидрофобните АКО в сравнение с хидрофилните е ключов фактор за висока способност за улавяне на хидроксилни радикали на фракцията с МТ под 1 кДа от хемолимфата *H. lucorum* [Г4; Г9].

IV.2. Изолиране и характеризиране на циклолипопептиди от *Bacillus velezensis* R22

Основните ми приноси в това изследване са свързани с:

- Разработена е методика за изолиране, пречистване и характеризиране на циклолипопептиди от безклетъчни супернатанти на *B. velezensis* R22. Посредством маспектрометрични анализи (LC-MS и LC-MS/MS) на UHPLC-Q-TOF система са определени основните активни съединения в екстракт от *B. velezensis* R22, като сърфактини с молекулна маса 1035.698 Да и 1057.7 Да, и фенгицини с молекулни маси 1462.8 Да, 1476.8 Да, 1490.8 Да и 1504.8 Да и са охарактеризирани първичните им структури [Г21].

Перспективи за научни изследвания през следващите 5 години

Изследователската ми работа ще продължи по гореописаните направления, като ще бъде надградена с нови обекти и разработване на нови подходи за изолиране и охарактеризиране на протеини, гликопротеини и АМП.

Перспективите за изследователската ми работа са тясно свързани с участието ми в следните проекти:

1. Проект ФНИ: КП-06-Н-81/6 от 04.12.2024 г.: „Нови биоконпоненти и биогенни наночастици от хемолимфата на морски охлюв *Rapana venosa* срещу рак на кожата“.
2. Проект ФНИ: КП-06-Н-61/8 от 2022 г.: „Разработване на нови биологични наночастици от слюзта на градински охлюв *Cornu aspersum*, като антимикробни агенти“.
3. Проект по ПБУ: BG-RRP-2.017-0009-C01: „Получаване на биофунгициден препарат от отпадна биомаса: биотехнология за устойчиво екоземеделие“ (по процедура BG-RRP-2.017: Финансиране на научноизследователски проекти в областта на зелените и цифровите технологии – 2).
4. Проект по ПБУ: BG-RRP-2.017-0006-C01: „Екологична технология за конверсия на отпадна биомаса до иновативен продукт (активен въглен) с широко приложение (ЕкоТехПродукт)“ (по процедура BG-RRP-2.017: Финансиране на научноизследователски проекти в областта на зелените и цифровите технологии – 2).
5. Проект BG05M2OP001-1.002-0019-C02, Център по компетентност „Чисти технологии за устойчива околна среда – води, отпадъци, енергия за кръгова икономика“ (Втори етап 2025-2029).

Основите акценти в работа ще бъдат насочени към:

I. Изследване на биоактивни съединения от природни източници, като нови природни терапевтици с антимикробна и антитуморна активност:

- Изолиране, идентифициране и характеризиране на биоконпоненти - вторични метаболити, пептиди, протеини и гликопротеини в хемолимфата на Гастроподи чрез съвременни методи и техники, включително хроматографски и електрофоретични анализи, изготвяне на протеомна карта и маспектрометрични изследвания.

II. Изследване възможностите за разработване на нови антимикробни и антитуморни средства въз основа на биомолекули от естествен произход в комбинация с нанотехнологии.

- Зелен синтез и характеризиране на биогенни наночастици с антитуморни свойства, медиирани от биоконпоненти в хемолимфата на морски охлюв *R. venosa*.

III. Изследване на механизма на антитуморно и антимикробно действие на различни биоконпоненти и биогенни наночастици чрез протеомен анализ на 1Д- или 2Д-електрофорези, последван от маспектрометрични анализи и биоинформатика. Идентифициране на ключови протеини, като потенциални терапевтични цели.

IV. Разработване на методология за пречистване и маспектрометрично идентифициране на липопептиди, продуцирани от *Bacillus* spp. за нуждите на екоземеделието.

V. Разработване на методология за определяне на пестициди или следи от пестициди в проби от околната среда.

Списък на публикации, участващи в конкурса за придобиване на академичната длъжност „професор“ по показател „В“:

- B1.** Dolashki, A., Velkova, L.*, Daskalova, E., Zheleva, N., Topalova, Y., Atanasov, V., Voelter, W., IF Q1
Dolashka, P. Antimicrobial Activities of Different Fractions from Mucus of the Garden Snail 4.717
Cornu aspersum. *Biomedicines* **2020**, 8(9), 315-332.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines8090315>
- B2.** Dolashki, A., Antonova O., Velkova L.*, Kaynarov D., Voelter W., Dolashka P. Selective IF Q1
cytotoxicity and changes in protein expression of T24 bladder carcinoma permanent cell line 4.46
after treatment with hemocyanins. *Current Medicinal Chemistry* **2022**, 29(42), 6479-6498.
<https://www.eurekaselect.com/article/125674>

- B3. Petrova, M., Vlahova, Z., Schröder, M., Todorova, J., Tzintzarov, A., Gospodinov, A., **Velkova, L.***, Kaynarov, D., Dolashki, A., Dolashka, P., Ugrinova, I. Antitumor Activity of Bioactive Compounds from *Rapana venosa* against Human Breast Cell Lines. *Pharmaceuticals* **2023**, 16(2), 181. IF 4.67 Q1
<https://doi.org/10.3390/ph16020181>
- B4. Kaynarov D., Marinova, K. Marinova, R., Petkov, P., **Velkova, L.***, Dolashki, A., Petrov, P., Litov, L., Lilkova, E., Dolashka, P., Ilieva, N. In silico and physico-chemical characterization of cluster formation dynamics in peptide solutions. *Biochemistry and Biophysics Reports* **2024**, 39, 101753. IF 2.79 Q2
<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2024.101753>
- B5. **Velkova L.***, Dolashki A, Petrova V, Pisareva E, Kaynarov D, Kermedchiev M, Todorova M, Dolashka P. Antibacterial Properties of Peptide and Protein Fractions from Cornu aspersum Mucus. *Molecules* **2024**, 29(12), 2886. IF 4.79 Q1
<https://doi.org/10.3390/molecules29122886>
- B6. Atanasov, V., **Velkova, L.***, Tancheva, L., Dolashki, A., Kalin, R., Dolashka, P. Key proteins in rat cerebral cortex: application of *Cornu aspersum* extract as neuroprotective agent in Alzheimer's type dementia. *Molecules* **2024**, 29(22), 5375. IF 4.2 Q1
<https://doi.org/10.3390/molecules29225375>

Списък на публикации, участващи в конкурса за придобиване на академичната длъжност „професор“ по показател „Г“:

- Г1. Vassilev, N. G., Simova, S., Dangelov, M., **Velkova, L.**, Atanasov, V., Dolashki, A., Dolashka, P. An ¹H NMR and MS based study of metabolomics profiling of garden snail *Helix aspersa* Mucus. *Metabolites* **2020**, 10(9), 360-374. IF 4.097 Q2
<https://doi.org/10.3390/metabo10090360>
- Г2. Georgieva, A., Todorova, K., Iliev, I., Dilcheva, V., Vladov, I., Petkova, S., Toshkova, R., **Velkova, L.**, Dolashki, A., Dolashka, P. Hemocyanins from *Helix* and *Rapana* snails exhibit *in vitro* antitumor effects in human colorectal adenocarcinoma. *Biomedicines* **2020**, 8(7), 194-207. IF 4.717 Q1
<https://doi.org/10.3390/biomedicines8070194>
- Г3. Ilieva, N., Petkov, P., Lilkova, E., Lazarova, T., Dolashki, A., **Velkova, L.**, Dolashka, P., Litov, L. *In Silico* study on the structure of novel natural bioactive peptides. *Lecture Notes in Computer Science (LNCS)*, Springer Verlag **2020**, 11958, 332-339. IF 1.053 Q2
https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-41032-2_38
- Г4. Alexandrova, A., Petrov, L., **Velkova, L.**, Dolashki, A., Tsvetanova, E., Georgieva, A., Dolashka, P. Antioxidant activity of fractions isolated from hemolymph of garden snail *Helix lucorum*. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research* **2021**, 9(2), 143-152. IF 1.37 Q2
https://jppres.com/jppres/pdf/vol9/jppres20.935_9.2.143.pdf
- Г5. Idakieva, K., Todinova, S., Dolashki, A., **Velkova, L.**, Raynova, Y., Dolashka, P. Biophysical characterization of the structural stability of *Helix lucorum* hemocyanin. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **2021**, 35(1), 18-28. IF 1.762 Q3
<https://doi.org/10.1080/13102818.2020.1837010>
- Г6. Daskalova, A., Petrova, V., **Velkova, L.**, Kujumdzieva, A., Tomova, A., Voelter, W., Dolashka, P. Investigation of protein expression of *Saccharomyces cerevisiae* cells in quiescent and proliferating state before and after toxic stress. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **2021**, 35(1), 366-376. IF 1.762 Q3
<https://doi.org/10.1080/13102818.2021.1879677>
- Г7. Daskalova, A.V., Tomova, A.A., Kujumdzieva, A.V., **Velkova, L.G.**, Dolashka, P. A., Petrova, V.Y. Menadione and hydrogen peroxide trigger specific alterations in RNA polymerases profiles in quiescent *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* **2021**, 35(1), 1190-1199. IF 1.762 Q3
<https://doi.org/10.1080/13102818.2021.1941255>

- Г8. **Velkova, L.**, Daskalova, A., Dolashki, A., Dolashka, P., Vassilev, T. Immunomodulating potential of IgG antibodies with induced polyspecificity. *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences* **2021**, 74(10), 1488-1492. IF 0.378 Q3
http://www.proceedings.bas.bg/DOI/doi2021_a_08.html
- Г9. Vassilev, N., Simova, S., Dangalov, M., **Velkova, L.***, Atanasov, V., Dolashki, A., Dolashka, P. An ¹H NMR and MS based study of metabolomics profiling of garden snail *Helix lucorum* Hemolymph. *Bulgarian Chemical Communications* **2021**, 53A, 49-56. IF 0.398 Q4
http://www.bcc.bas.bg/BCC_Volumes/Volume_53_Special_A_2021/BCC2021-53-SI-A-049-056.pdf
- Г10. Aleksova, M., **Velkova, L.**, Dolashka, P., Radeva, G. Antibacterial activity of bioactive fractions from mucus and hemolymph of different snails species and crab. *Bulgarian Chemical Communications* **2021**, 53A, 022-026. IF 0.398 Q4
http://bcc.bas.bg/BCC_Volumes/Volume_53_Special_A_2021/BCC2021-53-SI-A-022-026.pdf
- Г11. Krumova, E., Dolashka, P., Abrashev, R., **Velkova, L.**, Dolashki, A., Daskalova, A., Dishliyska, V., Atanasov, V., Kaynarov, D., Angelova, M. Antifungal activity of separated fractions from the hemolymph of marine snail *Rapana venosa*. *Bulgarian Chemical Communications* **2021**, 53A, 042-048. IF 0.398 Q4
http://www.bcc.bas.bg/BCC_Volumes/Volume_53_Special_A_2021/BCC2021-53-SI-A-042-048.pdf
- Г12. Topalova, Y., Belouhova, M., **Velkova, L.**, Dolashki, A., Zheleva, N., Daskalova, E., Kaynarov, D., Dolashka, P. Effect and mechanisms of antibacterial peptide fraction from mucus of *Cornu aspersum* against *Escherichia coli* NBIMCC 8785. *Biomedicines* **2022**, 10(3), 672. IF 4.65 Q1
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10030672>
- Г13. Belouhova, M., Daskalova, E., Yotinov, I., Topalova, Y., **Velkova, L.**, Dolashki, A., Dolashka, P. Microbial diversity of garden snail mucus. *MicrobiologyOpen* **2022**, 11(1), e1263. IF 3.904 Q2
<https://doi.org/10.1002/mbo3.1263>
- Г14. Nikolova, M., Konstantinov, S., **Velkova, L.**, Kaynarov, D., Dolashki, A., Dolashka, P. Antitumour activity of different bioactive compounds from hemolymph and mucus of mollusca against human urinary bladder cancer cell lines. *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences* **2022**, 75(5), 726-736. IF 0.373 Q3
<https://doi.org/10.7546/CRABS.2022.05.13>
- Г15. Petrov, L., Kachaunov, M., Alexandrova, A., Tsvetanova, E., Georgieva, A., Dolashki, A., **Velkova, L.**, Dolashka, P. Snail Mucus Protective Effect on Ethanol-Induced Gastric Ulcers in Mice. *Life (MDPI)* **2022**, 12(8), 1106. IF 3.269 Q2
<https://doi.org/10.3390/life12081106>
- Г16. Tancheva, L., Lazarova, M., **Velkova, L.**, Dolashki, A., Uzunova, D., Minchev, B., Petkova-Kirova, P., Hassanova, Y., Gavrilova, P., Tasheva, K., Taseva, T., Hodzhev, Y., Atanasov, A. G., Stefanova, M., Alexandrova, A., Tzvetanova, E., Atanasov, V., Kalfin, R., Dolashka, P. Beneficial Effects of Snail *Helix aspersa* Extract in an Experimental Model of Alzheimer's Type Dementia. *Journal of Alzheimer's Disease* **2022**, 88(1), 155-175. IF 4.819 Q1
<https://journals.sagepub.com/doi/full/10.3233/JAD-215693>
- Г17. Daskalova, E., Zheleva, N., Belouhova M., Topalova Y., **Velkova, L.**, Dolashki, A., Dolashka P. Antibacterial activity of combined nanodiamonds and snail fractions with biocompounds with mw below 10 kDa and above 30 kDa. *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences* **2023**, 76(1), 35-43. IF 0.3 Q3
<https://doi.org/10.7546/CRABS.2023.01.04>
- Г18. Petrova, M., Vlahova, Z., Schröder, M., Tzintzarov, A., **Velkova L.**, Kaynarov, D., Dolashki, A., Dolashka, P., Ugrinova, I. Anti-tumour activity of bioactive compounds isolated from the hemolymph and mucus of the garden snail *Helix aspersa* against a panel of human cancer cell lines. *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences* **2023**, 76(9), 1350-1359. IF 0.3 Q3
<https://doi.org/10.7546/CRABS.2023.09.05>

- Г19. Kirilova M, Topalova Y, **Velkova L.***, Dolashki A, Kaynarov D, Daskalova E, Zheleva N. IF Q1
Antibacterial Action of Protein Fraction Isolated from *Rapana venosa* Hemolymph against 4.3
Escherichia coli NBIMCC 8785. *Pharmaceuticals (Basel)* **2024**, 17(1), 68.
<https://doi.org/10.3390/ph17010068>
- Г20. Armenova, N., Petrova, P., Gerginova, M., Krumova, E., Kaynarov, D., **Velkova, L.**, Dolashka, IF Q3
P., Petrov, K. *Bacillus velezensis* R22 inhibits the growth of multiple fungal phytopathogens by 1.5
producing surfactin and four fengycin homologues. *Biotechnology and Biotechnological
Equipment* **2024**, 38, art.no 2313072.
<https://doi.org/10.1080/13102818.2024.2313072>
- Г21. Alexandrova, A., Petrov, L., Tsvetanova, E., Georgieva, A., **Velkova, L.**, Atanasov, V., IF Q2
Dolashki, A., Dolashka, P., Mileva, M. Isolation, identification and redox-modulation capacity of 1.2
hemolymph's subunits from *Rapana venosa* inhabiting the Bulgarian Black sea. *Farmacia* **2024**,
72(4), 917-923.
<https://doi.org/10.31925/farmacia.2024.4.20>
- Г22. **Velkova, L.**, Abrashev, R., Miteva-Staleva, J., Dishliyska, V., Dolashki, A., Spasova, B., IF Q1
Dolashka, P., Angelova, M., Krumova, E. The Role of Oxidative Stress in Antifungal Activity of 4.9
Two Mollusc Fractions on Resistant Fungal Strains. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, 26(3), 985.
<https://doi.org/10.3390/ijms26030985>

Списък на патенти и полезни модели, участващи в конкурса за придобиване на академичната длъжност „професор“:

- Г(1). Изобретение Полезен модел „Състав с антибактериално действие“, Номер на заявка №5317 от 07.06.2021 г., Номер на защита №4101, дата на издаване 11.08.2021 (Изобретатели: Павлинка Александрова ДОЛАШКА, Александър Константинов ДОЛАШКИ, **Людмила Георгиева ВЕЛКОВА**), заявител: Институт по органична химия с Център по фитохимия- БАН. Срок на закрила 07.06.2025, Статус - Действащ ПМ. https://portal.bpo.bg/bpo_online/-/bpo/utility-model-detail
- Г(2). Изобретение Полезен модел „Средство за благоприятно повлияване на деменция от Алцхаймеров тип“, Номер на заявка №5699 от 15.03.2023 г., Номер на защита 4426, дата на издаване/регистрация 26.04.2023 (Изобретатели: Павлинка Александрова ДОЛАШКА, **Людмила Георгиева ВЕЛКОВА**, Александър Константинов ДОЛАШКИ, Любка Павлова Танчева, Рени Емил Калфин), заявители: Институт по органична химия с Център по фитохимия- БАН, Институт по невробиология – БАН). Срок на закрила - 15.03.2027, Статус - Действащ ПМ. https://portal.bpo.bg/bpo_online/-/bpo/utility-model-detail

Справка за разпределението на научните трудове на доц. д-р Л. Велкова, с които кандидатства в настоящия конкурс:

Общ брой публикации: 28 бр. с импакт фактор (Общ импакт фактор – 64.853).

Разпределение по квартали съгласно SJR (www.scimagojr.com) както следва:

Q1	10 бр.
Q2	7 бр.
Q3	8 бр.
Q4	3 бр.

Полезни модели: 2 бр.

Автор за кореспонденция и/или първи автор в 10 публикации.