

Резюмета на публикациите на доц. Иван Илиев за участие в конкурс за заемане на академична длъжност „Професор“, (на български език)

1. Danalev, D., Borisova, D., Yaneva, S., Georgieva, M., Balacheva, A., Dzimbova, T., **Илиев, I.**, Pajpanova, T., Zaharieva, Z., Givechev, I., Naydenova, E. Synthesis, *in vitro* biological activity, hydrolytic stability and docking of new analogs of BIM-23052 containing halogenated amino acids. *Amino Acids*, 2020, 52(11-12): 1581-1592, ISSN: 0939-4451, **IF: 3.520, Q1**

### Резюме

Един от мощните соматостатинови аналози, BIM-23052 (DC-23-99) d-Phe-Phe-Phe-d-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH<sub>2</sub>, е установено при *in vitro* условия, че притежава инхибиторна активност върху растежния хормон в пМ концентрации. Той се характеризира и с висок афинитет към някои соматостатинови рецептори, които са широко разпространени в клетъчните мембрани на много туморни клетки. В настоящото изследване представяме синтеза на серия аналози на BIM-23052, съдържащи халогенирани Phe остатъци, използвайки стандартен твърдофазен пептиден метод Fmoc / OtBu-стратегия. Цитотоксичните ефекти на съединенията са тествани *in vitro* срещу две човешки туморни клетъчни линии - рак на гърдата и хепатоцелуларен карцином, както и върху човешка нетуморогенна епителна клетъчна линия. Анализите, съдържащи флуоро-фенилаланини, са цитотоксични в  $\mu\text{M}$  диапазон, като аналогът, съдържащ Phe (2-F), показва по-добра селективност срещу хепатоцелуларен карцином. Представеното проучване също така разкрива, че натрупването на халогенирани Phe остатъци не увеличава цитотоксичността, при тестваните клетъчни линии. Изчисленият селективен индекс разкрива различни механизми на противотуморна активност на изходното съединение BIM-23052 и изследваните халогенирани аналози, при рак на гърдата. Всички тествани пептиди имат висока противотуморна активност срещу клетъчната линия HepG2 ( $\text{IC}_{50} \approx 100 \mu\text{M}$  и  $\text{SI} > 5$ ) в сравнение с нетуморогенните клетки. Това вероятно се дължи на високата пропускливост на клетъчната мембрана и по-високата метаболитна активност на хепатоцитите. *In silico docking* проучванията потвърждават, че всички получени аналози се свързват добре със соматостатиновите рецептори, с предпочитание към ssrt3 и ssrt5. Всички целеви съединения показват висока хидролитична стабилност при киселинно и неутрално pH, което имитира физиологичното състояние в стомаха и човешката плазма.

2. Georgieva, M., Balacheva, A., Detcheva, R., **Илиев, I.**, Nives, G., Pajpanova, T. New aroyl hidrazones combined with specific peptide analogues: looking for possible enhanced cytotoxic effects. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, 2020, 55(6): 1994-1998, ISSN: 1314-7471, **SJR: 0.220, Q3**

### Резюме

Ароил хидразоните са интензивно изследвани през последните десетилетия поради техните разнообразни биологични свойства, като противоракови, антибактериални и антимикробни ефекти. В настоящата работа ние изследваме антипролиферативния ефект на два нови ароил хидразона, използвани в комбинация с AVPI- и RGD- пептиди. Антипролиферативната

активност е проверена чрез МТТ-тест след 72 часа инкубация, върху рак на гърдата (MDA-MB-231 клетки). Въпреки че производните на ароил хидразон, приложени самостоятелно, показват висока активност, комбиниран синергичен ефект не се наблюдава.

3. Jaber, S., **Илев, I.**, Angelova, T., Nemska, V., Sulikovska, I., Naydenova, E., Georgieva, N., Givechev, I., Grabchev, I., Danalev, D. Synthesis, Antitumor and Antibacterial Studies of New Shortened Analogues of (KLAKLAK)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> and Their Conjugates Containing Unnatural Amino Acids. *Molecules*, 2021, 26(4): 898, ISSN: 1420-3049, **IF: 4.927, Q1**

### Резюме

Пептидът (KLAKLAK)<sub>2</sub> е представител на група пептиди с антимикробна активност, който показва и добри противоракови свойства. В настоящото изследване представяме синтез, използвайки SPPS, и характеризиране чрез HPLC/MS на серия от къси аналози на (KLAKLAK)<sub>2</sub>. Те съдържат KLAKLAK с една последователност, като C-терминални амиди. Освен това е осъществено заместване на някои естествени аминокиселини с неестествени β-Ala и *nor*-Leu. В допълнение, тези структури са конюгирани с втори фармакофор с доказани противоракови свойства - 1,8-нафталимид или кафеена киселина. Изследвани са цитотоксичността, антипролиферативният ефект и антимикробната активност на новосинтезираните структури. Получените експериментални резултати показват значителен селективен индекс за веществата с обща химична структура KLβAKLβAK-NH<sub>2</sub>. Антибактериалните свойства на новосинтезирани аналози при две различни концентрации 10 μM и 20 μM бяха тествани срещу Грам-отрицателни микроорганизми *Escherichia coli* K12 407. Само две от изследваните съединения KLAKLAK-NH<sub>2</sub> и едното, конюгирано с втори фармакофор 1,8-нафталимид и неестествена аминокиселина *nor*-Leu, показаха умерена активност срещу тестваните щамове при концентрация 20 μM. Получените резултати показват, че въвеждането на 1,8-нафталимид, Gly- и Caf- увеличава цитотоксичността и антипролиферативната активност на пептидите, но не и тяхната селективност. Само две съединения KLAKLAK-NH<sub>2</sub> и 1,8-нафталимид-GK<sub>n</sub>LAK<sub>n</sub>LAK-NH<sub>2</sub> показват умерена активност срещу *Escherichia coli* K12 при концентрация от 20 μM.

4. Jaber, S., Nemska, V., **Илев, I.**, Ivanova, E., Foteva, T., Georgieva, N., Givechev, I., Naydenova, E., Karadjova, V., Danalev, D. Synthesis and Biological Studies on (KLAKLAK)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> Analog Containing Unnatural Amino Acid β-Ala and Conjugates with Second Pharmacophore. *Molecules*, 2021, 26(23): 7321, ISSN: 1420-3049, **IF: 4.927, Q1**

### Резюме

Пептидите са добри кандидати за противоракови лекарства поради естественото им съществуване в организма и липсата на странични ефекти. (KLAKLAK)<sub>2</sub> е антимикробен пептид, който показва добри противоракови свойства. За синтеза на целеви молекули, аналози на (KLAKLAK)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, е използван твърдофазен пептиден синтез (Fmoc-стратегия). Чистотата на всички съединения е наблюдавана чрез HPLC, а техните структури са доказани с помощта на маспектрометрия. Цитотоксичността и антипролиферативните ефекти са изследвани съответно с помощта на 3T3 NRU- и МТТ-тест. За определяне на антимикробната активност е използван дисково-дифузионен метод. Хидролитичната

стабилност при три стойности на рН, които имитират физиологичното рН в организма, е изследвана с помощта на HPLC. За конюгатите NphtG-(KLAKLAK)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> и Caf-(KLAKLAK)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> е установена селективност срещу туморните клетки MCF-7, комбиниран с ниска цитотоксичност и силен антипролиферативен ефект. Същите съединения показва много добри противогъбични свойства и пълна хидролитична стабилност в продължение на 72 часа. Съединението Caf-(KLβ-AKLβ-AK)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, съдържащо β-Ala в своите структури, показва добра антимикробна активност срещу *Escherichia coli* K12 407 и *Bacillus subtilis* 3562, в комбинация с много добри антипролиферативни и цитотоксични свойства, както и хидролитична стабилност. Получените резултати показват, че всички синтезирани конюгати могат да бъдат полезни в медицинската практика като противоракови или антимикробни средства.

5. Danalev, D., **Илев, I.**, Borisova, D., Dzimbova, T., Pajpanova, T., Zaharieva, Z., Karadjova, V., Foteva, T., Naydenova, E. Synthesis, Anticancer Activity, Docking Calculations and Hydrolytic Stability Studies of Bioconjugates of Monofluorenated Analogue of BIM-23052. *Protein & Peptide Letters*, 2022, 29(8): 721-731, ISSN: 0929-8665, **IF: 1.600, Q3**

## Резюме

Борбата срещу рака започва още от откриването му и не е стихнала до днес. В момента хибридни молекули са се превърнали в обещаваща алтернатива на стандартните химиотерапевтици за лечение на заболявания, включително рак. В настоящото изследване представяме синтеза, биологичната оценка, математическите докинг изчисления и хидролитичната стабилност на новите биоконюгати на монофлуорирани аналози на BIM-23052, съдържащи втори фармакофор нафталимид, кафеена киселина или трипептида Arg-Gly-Asp. Всички нови молекули са получени чрез стандартен пептиден синтез върху твърд носител. Противораковият потенциал е изследван спрямо панел от туморни клетъчни линии, включващи човешки клетъчни линии на карцином на млечната жлеза MCF-7 (ER+, PR+ и Her-2-); MDA-MB-231 (ER-, PR- и Her-2-), както и клетъчни линии BALB 3T3 (миши ембрионални фибробласти) и MCF-10A (епителни клетки). Стойностите на IC<sub>50</sub>, получени в анализа на клетъчна линия MCF-10A, бяха използвани за изчисляване на селективния индекс (SI). Най-високият SI спрямо MCF-7, със стойност 2.62, е показан от съединението Npht-Gly-D-Phe-Phe(4-F)-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH<sub>2</sub>. В клетки MCF-10, най-слабият антипролиферативен ефект е причинен от същото съединение (IC<sub>50</sub> = 622.9 ± 23.91 μM), което прави този аналог добър кандидат за новото противораково лекарство. За съжаление, проучванията за хидролитична стабилност показват, че този биоконюгат е най-нестабилен по отношение на хидролизата при физиологични условия в организма. Дори с по-ниска противоракова активност и селективност в сравнение с Npht-Gly-DPhe-Phe(4-F)-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH<sub>2</sub>, съединението Arg-Gly-Asp-D-Phe-Phe(4-F)-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH<sub>2</sub> е най-добрият кандидат между три изследвани биоконюгата за практическо приложение, поради комбинацията от профили на активност и стабилност. Докинг анализът показва, че синтезираните биоконюгати показват селективност спрямо различни соматостатинови рецептори на повърхността на различни клетъчни линии.

6. Danalev, D., **Илев, I.**, Dobrev, S., Angelova, S., Petrin, S., Dzimbova, T., Ivanova, E., Borisova, D., Naydenova, E. Synthesis, Antiproliferative Effect and In Silico LogP

### Резюме

Хидрофобността е ограничаващ фактор за способността на молекулите да преминават през клетъчните мембрани и да изпълняват своята функция. Способността за ефективно проникване до цитозола е особено важна, когато едно синтетично съединение има потенциал за лекарство. D-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH<sub>2</sub> (BIM-23052) е линеен аналог на соматостатин с установена *in vitro* GH-инхибиторна активност в наномоларни (nM) концентрации и висок афинитет към различни соматостатинови рецептори. Синтезирани са серия от аналози на BIM-23052, където остатъците на Phe в молекулата на BIM-23052 са заменени с Tyr, използвайки стандартна SPPS, Fmoc/t-Bu стратегия. Анализите на целевите съединения са извършени с помощта на HPLC/MS техника. Токсичността и антипролиферативната активност са изследвани с помощта на *in vitro* NRU- и МТТ-анализ. Стойностите на logP (коефициент на разпределение в октанол/вода) за BIM-23052 и неговите аналози бяха изчислени. Получените данни показват най-добър антипролиферативен ефект срещу изследваните ракови клетки за съединението D-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Tyr<sup>7</sup>-Thr-NH<sub>2</sub> (DD8), най-липофилното съединение според прогнозираните стойности на logP. Анализа на получените данни показва, че съединението D-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Tyr<sup>7</sup>-Thr-NH<sub>2</sub> (DD8), където един Phe е заменен с Tyr, има най-добрата комбинация от цитотоксичност, антипролиферативен ефект и хидролитична стабилност.

7. Jaber, S., Nemska, V., **Илев, I.**, Ivanova, E., Foteva, T., Georgieva, N., Givechev, I., Tanev, D., Naydenova, E., Danalev, D. Synthesis, antiproliferative and antimicrobial activities of (KLAKLAK)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> analogue containing nor-Leu and its conjugates with a second pharmacophore. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2023, 37(1): 151-158, ISSN: 1310-2818, **IF: 1.500, Q3**

### Резюме

Пептидите са обещаваща алтернатива на конвенционалните лекарства за лечение на различни заболявания, тъй като имат сравнително малко странични ефекти, поради естествените механизми за тяхното елиминиране. На фармацевтичния пазар има много примери за лекарства, базирани на модифицирани аминокиселини и пептиди. В настоящата статия представяме синтеза и изследванията на антимикробния пептид (KLAKLAK)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, където Leu е заменен с неестествената аминокиселина nor-Leu. Освен това, към пептидната част е въведен втори фармакофор с добре доказани противоракови свойства. Всички структури са синтезирани чрез конвенционален твърдофазен пептиден синтез. Антипролиферативната и антимикробната активност са изследвани съответно с помощта на МТТ-анализ и дисково-дифузионен тест. Анализите на биологичната активност показват, че въвеждането на nor-Leu в първичната структура на изходното съединение не води до повишаване на антипролиферативната активност. Въпреки това, комбинацията с втория фармакофор 1,8-нафталимид в хибридна структура 1,8-NphtG-(KNleAKNleAK)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> води до значително повишаване на антипролиферативните свойства. Антимикробните тестове показваха, че всички тествани съединения проявяват антимикробна активност. Пептидът и

вторият фармакофор имаха синергичен ефект. В комбинация с пълна хидролитична стабилност в продължение на 72 часа в моделни системи, съединението 1,8-NphtG-(KNleAKNleAK)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> е най-добрият кандидат за медицинско лекарство при лечението на аденокарцином на млечната жлеза тип А (MCF-7) в комбинация с антимикробни свойства.

8. Borisova, B., Nocheva, H., **Илев, I.**, Laronze-Cochard, M., Gerard, S., Petrin, S., Danalev, D. Synthesis and analgesic activity of new analogs of FELL tetrapeptide containing D-Phe in the first position. *Current Research in Biotechnology*, 2024, 8: 100249, ISSN: 2590-2628, **IF: 4.000, Q2**

### Резюме

Болката, независимо дали е остра или хронична, е едно от най-неприятните преживявания. Тя може да има различен произход и дългосрочни ефекти върху тялото, като физически дискомфорт, депресия, тревожност и социална изолация. Премахването и правилното лечение на болката е проблем, силно зависим както от източника, така и от индивидуалните характеристики на всеки организъм. Тук погледът е насочен към изследване на активността на нови аналози на естествения FELL пептид като обещаваща алтернатива на съществуващите антиболкови молекули. Всички целеви съединения са получени чрез конвенционален пептиден синтез върху твърд носител, използвайки стандартен Fmoc/OtBu подход, а тяхната аналгетична активност е оценена чрез Paw-pressure - тест (Randall-Selitto). Определянето на *in vivo* аналгетичната активност на новосинтезираните вещества показва, че заместването на Leu (BB11) с Val остатъци (BB8) увеличава PPT на експерименталните животни на 10-ата минута, в сравнение със стойностите след инжектиране на немодифицираната родителска молекула. На 20-ата и 30-ата минута, аналгетичната активност на BB8 беше сравнима с тази на BB11 и се наблюдаваше допълнително намаление на PPT. Освен това, в сравнение с контролите, аналгезията съществува до края на наблюдавания период от 50 минути. Другите три новосинтезирани вещества, включително Nle (BB6), Ile (BB7) и троен Leu (BB5), вместо двойни Leu остатъци, показаха променлива във времето краткосрочна аналгетична активност, която не достигна тази на изходната молекула BB11. Крайните резултати показват, че D-Phe на първа позиция в молекулата, комбиниран с двата Leu остатъка на трета и четвърта позиция, са най-добрата комбинация по отношение на аналгетичната активност. Освен това, удължаването на пептидната верига чрез добавяне на още един хидрофобен остатък също има положителен ефект върху получената аналгезия. Цитотоксичността на крайните молекули е значително по-ниска от тази на SLS (положителна контрола), комбинирана с пълна хидролитична стабилност, което позволява безопасното им използване във фармацията.

9. Angelova, N., **Илев, I.**, Nemska, V., Dzimbova, T., Georgieva, N., Danalev, D., Naydenova, E. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of New Analogs of Aurein 1.2 Containing Non-Proteinogenic Amino Acids. *Molecules*, 2025, 30(9): 2050, ISSN: 1420-3049, **IF: 4.600, Q1**

### Резюме

Широката употреба на класически антибиотици доведе до поява на резистентни щамове на патогенни бактерии. За да се справят с това предизвикателство, изследователите се обърнаха към антимикробните пептиди (AMP). Беше демонстрирано, че ауреин 1.2

(GLFDIHKIAESF-NH<sub>2</sub>) има широк спектър на бифункционалност срещу бактериални и ракови клетки. За синтеза на нови аналози на ауреин 1.2 беше използвана твърдофазна пептидна синтеза (Fmoc-стратегия). Чистотата на всички съединения е наблюдавана чрез HPLC, а техните структури бяха доказани с помощта на маспектрометрия. Цитотоксичността и антипролиферативните ефекти са изследвани съответно с помощта на 3T3 NRU- и МТТ-тест. Антибактериалната активност беше оценена срещу грам-положителни и грам-отрицателни бактерии, в концентрации от 0 до 320 µg/mL, за да се определи минималната инхибираща концентрация (MIC) и минималната бактерицидна концентрация (MBC). Тестът за антипролиферативна активност показва, че пептидният аналог EH [Orn]<sup>8</sup> има най-висока активност (IC<sub>50</sub> = 44.33 ± 1.08 µM) за трите изследвани клетъчни линии (MCF-12F, MCF-7 и MDA-MB-231). Същото съединение е показало добра антимикробна активност. Получените резултати показват, че заместването на Lys с непротеиногенни аминокиселини може да увеличи както ефикасността, така и спектрите на активност на естествените матрични пептиди, което ги прави подходящи кандидати за разработване на нови лекарства.

10. Dimitrova, D., Nemska, V., **Iliev, I.**, Petrin, S., Georgieva, N., Danalev, D. New Temporin A Analogues Modified in Positions 1 and 10—Synthesis and Biological Studies. *Pharmaceutics*, 2025, 17(4): 396, ISSN: 1999-4923, **IF: 5.500, Q1**

## Резюме

С нарастващата антимикробна резистентност, прекомерната употреба на антибиотици и застоя в откриването на нови антибиотици, е необходима нова алтернатива за преодоляване на труднолечимите инфекции. Антимикробните пептиди (АМП) показват голям потенциал като възможна алтернатива на стандартните химиотерапевтици. Темпорините са група АМП, които са обект на внимание в множество изследвания. В настоящото изследване представяме дизайн и синтез на Темпорин А, модифициран в позиция 1, където протеиногенната аминокиселина Phe е заменена с Tug или флуориран Phe. Освен това, в други аналози, в позиция 10, Ser остатъкът е заменен с Tug или Thr. Целта на всички модификации в първичната структура на нативния Темпорин А е да се изследва влиянието на направените промени върху антибактериалните свойства, антипролиферативната активност и хидролитичната стабилност на новосинтезираните молекули. За синтеза на новите аналози е използвана стратегията Fmoc/OBt SPPS. Антибактериалната активност е оценена, чрез дискова дифузия с метода на микроразреждане в бульон. За определяне на безопасността и антипролиферативната активност бяха използвани BALB 3T3 NRU тест и МТТ тест. Изследваните аналози имат ниска токсичност и са фотобезопасни. Най-голяма селективност е показана от DT<sub>Tug</sub>10 към MCF-7 клетки. DT4F, съдържащ флуориран Phe в позиция 1, е най-ефективният антибактериален агент сред новите съединения. Включването на Thr в позиция 10, в сравнение с естествения Ser остатък, води до повишаване на антипролиферативния ефект на новия пептид. Получените данни за връзката структура-активност показват, че най-обещаващото съединение в тестваната серия е FLPLIGRVL-Y-GILNH<sub>2</sub>, където Ser остатъкът в позиция 10 е заменен с по-хидрофобен OH-съдържащ Tug остатък. Аналогът, съдържащ флуориран Phe в позиция 1, DT4F, има най-висок антипролиферативен ефект срещу двете тествани туморни клетъчни линии, комбиниран с

добри антибактериални свойства при най-ниската MIC (80 µg/mL), но е по-цитотоксичен от изходната DTA молекула и не е стабилен при pH 9 за период от 24 часа.

11. **Пиев, I.**, Kontrec, D., Detcheva, R., Georgieva, M., Balacheva, A., Galic, N., Pajpanova, T. Cancer cell growth inhibition by aroylhydrazone derivatives. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2019, 33(1): 756-763, ISSN: 1310-2818, **IF: 1.186, Q3**

### **Резюме**

Хидразоните притежават многостранни свойства, които ги правят обещаващи за редица възможни приложения. В това проучване изследвахме библиотека от 17 ароилхидразона, получени от хидразид на никотинова киселина (1-12) и хидразид на изоникотинова киселина (А-Е), създадени от нас заради тяхната биологична активност. Антипролиферативната активност на съединенията беше изследвана върху нетуморни клетки MCF-10A и ракови клетъчни линии, MCF-7 и MDA-MB-231. Четири съединения бяха избрани като най-активни в инхибирането на клетъчния растеж на туморните клетъчни линии. Тези съединения, 5, 11, С и Е, бяха тествани повторно върху четири допълнителни клетъчни линии: нетуморни ВJ и ракови клетъчни линии (HeLa, HepG2 и HT-29). Съединения 5 и Е показаха най-висок индекс на селективност върху ракови клетъчни линии MDA-MB-231, HeLa и HepG2. Висока селективност към MCF-7 клетки беше наблюдавана, при съединение 5. Съединение С беше с висока селективност към HepG2 клетките, както и към MDA-MB-231, но в по-малка степен. Съединение 11 показва селективност срещу MDA-MB-231. Получените резултати позволяват да се оцени връзката структура-активност на съединенията и дават представа за по-нататъшното развитие на тази група ароилхидразони като по-мощни и селективни антинеопластични средства.

12. Danailova, A., Krumova, S., **Пиев, I.**, Gartcheva, L., Taneva, S., Todinova, S. Calorimetric markers for inflammation in *in vivo* experimental models. *International Journal Bioautomation*, 2019, 23(4): 479-488, ISSN: 1314-1902, **SJR: 0.242, Q3**

### **Резюме**

В тази работа е приложена диференциална сканираща калориметрия за определяне на специфични калориметрични характеристики на протеома на кръвна плазма, свързани със стимулиране на имуен отговор в експериментален модел (бели плъхове Wistar). Изследвано е термодинамичното поведение на кръвната плазма на мъжки и женски животни, подкожно инжектирани с яйчен албумин (ЕА). Калориметричните профили на кръвната плазма от третирани с ЕА плъхове показват намален топлинен капацитет на прехода, характерен за албумин, и изместен нагоре среднопретеглен център на термограмата в сравнение с не третирани контроли, като ефектът е по-изразен при мъжките животни. Увеличение на амплитудата на основния преход при 70°C е наблюдавано при женски плъхове след третиране с ЕА, което води до по-висока калориметрична енталпия. Обща характеристика на термограмите на третирани с ЕА мъжки и женски животни е разширяването на преходите над 75°C и появата на екзотермичен преход над 90°C, поради агрегация на протеини. Нашето проучване ясно разкрива специфичен за пола имуен отговор, при плъхове и допринася за по-добро разбиране на корелацията между

калориметричните характеристики на кръвната плазма и имунологичните промени, при експерименталните животни.

13. Mateva, R., Georgieva, A., **Илев, I.**, Toshkova, R., Pajpanova, T. Antiproliferative and apoptogenic effects of myosmine on erythroleukemia and hepatocellular carcinoma cells. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2019, 33(1): 613-619, ISSN: 1310-2818, **IF: 1.186, Q3**

#### **Резюме**

Миозмин, 3-(1-пиролин-2-ил) пиридин, е второстепенен тютюнев алкалоид, който е открит и в различни широко използвани храни. Напоследък този фитохимикал привлича все по-голям интерес като потенциален рисков фактор за развитието на езофагеален аденокарцином. Това проучване имаше за цел да изследва ефектите на миозмина върху клетъчната жизнеспособност и пролиферативната активност, при клетки на еритролекемия и хепатоцелуларен карцином и да получи допълнителна информация за механизмите, лежащи в основата на неговата цитотоксична активност. *In vitro* цитотоксичният ефект на миозмина върху туморните клетъчни линии HepG2 и MEL беше оценен чрез МТТ тест и оцветяване с трипаново синьо. Промените в морфологията на туморните клетки, индуцирани от миозмин, бяха анализирани, чрез флуоресцентна микроскопия след оцветяване с акридин оранж (АО) / етидиев бромид (EtBr) и 40,6-диамидин-20-фенилиндол дихидрохлорид (DAPI). Оцветяване с Анексин V-FITC / пропидиев йодид (PI) беше използвано за оценка на способността на миозмина да индуцира апоптоза. Модулиращото действие на антиоксидантната активност върху индуцираната от миозмин цитотоксичност срещу туморната клетъчна линия HepG2 също беше изследвано. Тестовете за клетъчна жизнеспособност показаха, че миозминът индуцира значително дозозависимо намаляване на жизнеспособността и пролиферативната активност на двете туморни клетъчни линии. Флуоресцентни микроскопски изследвания разкриха забележими промени в морфологията на третираните с миозмин туморни клетки с признаци на инхибиране на клетъчния цикъл и апоптоза. Комбинацията на миозмин с витамин С показва модулираща активност на витамин С върху цитотоксичния ефект на миозмин с вариации, зависими от концентрацията и времето на третиране. Представените резултати биха могли да допринесат за оценка на потенциалните здравни рискове, свързани с диетичната експозиция на миозмин.

14. Vasileva, A., **Илев, I.**, Lozanov, V., Dimitrova, M., Mitev, V., Ivanov, I. *In vitro* study on the antitumor activity of *Tanacetum vulgare* L. extracts. *Bulgarian Chemical Communications*, 2019, 51(2): 249-255, ISSN: 0861-9808, **SJR: 0.142, Q4**

#### **Резюме**

Основните нелетливи съединения, получени от екстракти и фракции от цветовете на *Tanacetum vulgare* L., бяха определени чрез LC-HRMS. Основните съединения в суровия екстракт бяха определени като: шест хидроксицинамоилхинови киселини с 4,5-дикафеоилхинова киселина и дванадесет флавоноида и техните производни, шест от които бяха под формата на флавоноид-О-глюкурониди. Основният флавоноиден агликон във вратигата беше лутеолин. Екстрактите и фракциите бяха тествани при *in vitro* условия в

девет клетъчни линии - една контролна нетуморогенна и осем туморни линии, при което противотуморна активност беше наблюдавана след 72 часа инкубация с гореспоменатите вещества, определена чрез МТТ анализ. Получените резултати показват най-висок индекс на селективност за етилацетатния екстракт от Flores Tanacetii (EAFT) и за етилацетатната фракция на суровия екстракт (EACE). Установено е, че екстрактът EAFT проявява най-висок противотуморен ефект, следван от EACE. От горните резултати става ясно, че етилацетатните екстракти от *T. vulgare* съдържат вещества с висока селективна активност срещу туморни клетки.

15. Georgieva, A., Todorova, K., **Илев, 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, ISSN: 2227-9059, **IF: 6.081, Q1**

### Резюме

Хемоцианините са кислород-транспортиращи гликопротеини в хемолимфата на членестоноги и мекотели, които привличат научен интерес с разнообразната си биологична активност и потенциални приложения във фармацията и медицината. Целта на настоящото изследване е да се оцени *in vitro* противотуморната активност на хемоцианини, изолирани от морски охлюв *Rapana venosa* (RvH) и градински охлюви *Helix lucorum* (HlH) и *Helix aspersa* (HaH), както и от слузта на охлюви *H. aspersa*, в клетъчната линия HT-29 за човешки колоректален карцином. Ефектите на хемоцианините върху клетъчната жизнеспособност и пролиферация бяха анализирани чрез МТТ анализ, а промените в морфологията на туморните клетки бяха изследвани чрез флуоресцентна и трансмисионна електронна микроскопия. Резултатите показаха, че слузта и  $\alpha$ -субединицата на хемоцианина от охлюва *H. aspersa* имат най-значителна антипролиферативна активност от тестваните проби. Цитоморфологичният анализ разкри, че наблюдаваните противотуморни ефекти са свързани с индуциране на апоптоза, при туморните клетки. Представените данни показват, че хемоцианините и слузта от *H. aspersa* имат антинеопластична активност и потенциал за разработване на нови терапевтични средства за лечение на колоректален карцином.

16. Georgieva, A., Todorova, K., **Илев, I.**, Dilcheva, V., Vladov, I., Petkova, S., Toshkova, R., Velkova, L., Atanasov, V., Dolashki, A., Dolashka, P. *In vitro* antitumor activity of hemocyanins isolated from *Helix aspersa* and *Helix lucorum* in human bladder carcinoma cells. *Compt. rend. Acad. bulg. Sci.*, 2021, 74(9): 1346-1353, ISSN: 1310-1331, **IF: 0.326, Q3**

### Резюме

Настоящото изследване има за цел да оцени *in vitro* антинеопластичния потенциал на общите хемоцианини, изолирани от *Helix aspersa* и *Helix lucorum* (HaH-total; HlH-total), техните структурни субединици ( $\beta$ c-HaH;  $\alpha$ -HaH;  $\beta$ c-HlH;  $\alpha$ -HlH) и слуз от *Helix aspersa* в клетъчна линия 5637 на човешки карцином на пикочния мехур. Ефектите на хемоцианините върху клетъчната жизнеспособност и пролиферативната активност бяха определени чрез МТТ тест. Морфологичните промени, индуцирани от хемоцианините в туморните клетки,

бяха анализирани чрез флуоресцентна микроскопия след оцветяване с АО/ЕВ и DAPI. Резултатите от МТТ теста показаха значителен антипролиферативен ефект на всички тествани проби от хемоцианини. Противотуморните ефекти на субединиците  $\alpha$ -НаН и  $\beta$ -НН бяха най-ясно изразени. Микроскопският анализ на третираниите с хемоцианин клетки на карцином на пикочния мехур разкри типични морфологични характеристики на апоптозата. Резултатите от нашето проучване показват, че освен известните имуногенни ефекти, хемоцианините от молюските имат и директна противотуморна активност срещу рак на пикочния мехур.

17. Dimitrov, M., **Пиев, I.**, Bardarov, K., Georgieva, D., Todorova, T. Phytochemical characterization and biological activity of apricot kernels' extract in yeast-cell based tests and hepatocellular and colorectal carcinoma cell line. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 279: 114333, ISSN: 0378-8741, **IF: 5.195, Q1**

### **Резюме**

Екстрактът от горчиви кайсиеви ядки съдържа широк спектър от биологично активни вещества, с голямо внимание върху амигдалина - цианогенния гликозид. Екстрактът се използва във фармацевтичната индустрия от години като съставка на различни фармацевтични продукти с противовъзпалителни, антимикробни или регенеративни свойства. В традиционната медицина горчивите кайсиеви ядки са известни като лекарство за респираторни заболявания и кожни заболявания. Кайсиевите ядки и амигдалинът често се предписват от практикуващи за профилактика и лечение на различни медицински състояния, включително колоректален рак. Настоящото изследване има за цел: да оцени фитохимичния състав и потенциалния антимутогенен, антирекомбиногенен и противотуморен ефект на екстракта от кайсиеви ядки при много ниски концентрации в тестове на базата на дрождеви клетки и клетъчни линии на хепатоцелуларен и колонокарцином при бозайници. Фитохимичният анализ е извършен чрез LC-MS профилиране. За определяне на количеството амигдалин в екстракта са приложени обратнофазова HPLC и UV детекция. Биологичната активност е оценена чрез мутагенност на Цимерман и Tu1 тест за ретропозиция. Цитотоксичната/антипролиферативна активност на екстракт от кайсиеви ядки е проведена върху четири типа клетъчни линии – HepG2, HT-29, BALB/3T3, клон А31 и VJ, използвайки стандартния МТТ-анализ за редуция на багрила. Резултатите разкриват наличието на повече от 1000 съединения и 4 цианогенни гликозида сред тях – Амигдалин, Дейдаклин, Линамарин и Прулауразин. Измерената концентрация на амигдалин е 57,8 g/mL. Всички концентрации на екстракта демонстрират силен антигенотоксичен, антирекомбиногенен, антимутогенен и антиканцерогенен ефект в тестовите с дрождеви клетки. Установена е висока селективност на действието на екстракта сред различни клетъчни линии на бозайници. Нормалната клетъчна линия VJ е резистентна към действието на екстракта. HepG2 се оказва най-чувствителна към действието на кайсиевите ядки. Настоящото изследване предоставя първия фитохимичен анализ на български горчиви кайсиеви ядки. Съобщени са три нови цианогенни гликозида. Получени са доказателства, че екстрактът от кайсиеви ядки при ниски концентрации не е в състояние да индуцира някои от събитията, свързани с началните етапи на туморогенезата. Освен това е установена висока селективност на действието на екстракта сред различните клетъчни линии. Най-чувствителната клетъчна линия е HepG2.

18. Semkova, S., Antov, G., **Iliev, I.**, Tsoneva, I., Lefterov, P., Christova, N., Nacheva, L., Stoineva, I., Kabaivanova, L., Staneva, G., Nikolova, B. Rhamnolipid Biosurfactants—Possible Natural Anticancer Agents and Autophagy Inhibitors. *Separations*, 2021, 8(7): 92, ISSN: 2297-8739, **IF: 3.344, Q2**

### Резюме

Редица биологично активни вещества са доказани като алтернатива на конвенционалните противоракови лекарства. Целта е *in vitro* изследване на противораковата активност на моно- и ди-рамнолипиди (RL-1 и RL-2) срещу рак на гърдата при хора. Освен това е анализирана комбинацията с цисплатин. Клетъчните линии MCF-10A, MCF-7 и MDA-MB-231 са третирани с RL и в комбинация с цисплатин. Жизнеността на клетките е анализирана с МТТ анализ, а изследването на автофагията е извършено чрез оцветяване с акридин оранж. За разлика от здравите клетки, и двете тествани ракови линии показват чувствителност към третиране с RL. Този ефект е съпроводен с влияние върху процеса на образуване на киселини, свързани с автофагията. Само за тройно негативната клетъчна линия на рак на гърдата (MDA-MB-231) е наблюдаван синергичен ефект от комбинираното действие (10  $\mu\text{M}$  цисплатин и 1  $\mu\text{g/mL}$  RL-2). Въз основа на проучвания върху реорганизацията на мембранните модели в присъствието на RL и данните за по-голямо количество липидни рафтове в мембраните на раковите клетки, отколкото в нетуморогенните, предполагаме възможен механизъм за ремоделиране на мембраната чрез образуване на ендозоми. За да се постигне синергичен ефект, е необходимо наличието на Цисплатин и RL-2, тъй като RL2 е молекула, индуцираща положителна кривина на мембраната.

19. Todinova, S., Nikolova, B., **Iliev, I.**, Semkova, S., Krumova, S., Taneva, S. Thermodynamic behaviour of breast cancer cell lines after miltefosine and cisplatin treatment. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2021, 147(14): 7819–7828, ISSN: 1388-6150, **IF: 4.755, Q1**

### Резюме

Ракът на гърдата показва различен отговор на лекарствено лечение. В тази работа анализирахме и сравняваме ефекта на две противоракови лекарства, различаващи се по основното си действие, милтефозин и цисплатин (cis-Pt), върху две различни клетъчни линии на рак на гърдата (нискометастатични (MCF-7) и високометастатични (MDA-MB-231)) и една нормална епителна (MCF-10A) клетъчна линия. Ефектът на cis-Pt и милтефозин върху термодинамичното поведение на раковите клетъчни линии беше анализиран чрез диференциална сканираща калориметрия, клетъчната морфология и жизнеспособност бяха определени чрез оптична микроскопия и МТТ тест. Разкрихме различни ефекти на милтефозин и cis-Pt върху термодинамичното поведение и жизнеспособността на раковите и нормалните клетки. Важно е, че нормалните MCF-10A клетки бяха драстично засегнати от милтефозин, докато при cis-Pt не се наблюдаваше ефект. Клетъчната линия MDA-MB-231, от друга страна, е по-податлива на cis-Pt отколкото клетките MCF-7, докато и двете ракови клетъчни линии са еднакво засегнати от милтефозин. Свързаната с лекарството промяна в термичните характеристики на клетъчните съставки корелира с промените в клетъчната жизнениост. Промененото термодинамично поведение на раковите клетки след

лекарствено третиране силно показва променени конформации на протеините в мембраната на раковите клетки и клетъчната матрица, както и структурите, съдържащи ДНК.

20. Yankova, I., Ivanova, E., Todorova, K., Georgieva, A., Dilcheva, V., Vladov, I., Petkova, S., Toshkova, R., Velkova, L., Dolashka, P., **Ииев, I.** Assessment of the toxicity and antiproliferative activity of hemocyanins from *Helix lucorum*, *Helix aspersa* and *Rapana venosa*. Bulgarian Chemical Communications, 2021, 53(Special Issue A): 15-21, ISSN: 0861-9808, **SJR: 0.168, Q4**

### Резюме

Хемоцианините (Hcs) са дихателни, кислород-пренасящи металопротеини, които са свободно разтворени в хемолимфата на мекотели и членестоноги. Интересът към хемоцианините нараства значително, след установяването, че те могат да се използват успешно в имунотерапията на неопластични заболявания, като неспецифични или активни стимулатори на имунната система. Настоящото изследване има за цел да оцени цитотоксичността, *in vivo* токсичността и антипролиферативната активност на хемоцианините, изолирани от морски охлюв *Rapana venosa* (RvH), градински охлюви *Helix lucorum* (Hh) и *Helix aspersa* (HaH). За *in vitro* тестове за безопасност е използван ЗТЗ Neutral Red Uptake (NRU) тест. Експериментите за антипролиферативна активност на хемоцианините са проведени чрез МТТ анализ върху панел от клетъчни линии - модел на рак на гърдата. *In vivo* токсикологичната оценка е извършена чрез редовни клинични прегледи на третирани с хемоцианин лабораторни мишки и хистопатологичен анализ на оцветени с хематоксилин/еозин препарати от паренхимни органи. Оценката на *in vitro* цитотоксичността показва, че тестваните хемоцианини не индуцират токсични ефекти в нетуморогенни епителни клетъчни линии. За разлика от това, значително намаляване на жизнеспособността на клетъчни линии на човешки карцином на гърдата е установено след третиране с високи концентрации на хемоцианини. *In vivo* експериментите не показват признаци на органна и системна токсичност при третираните с хемоцианин животни. Представените данни показват, че Hcs показват потенциал за разработване на нови противоракови терапии поради техните полезни свойства, биобезопасност и липса на токсичност или странични ефекти.

21. Kolev, I., Stoeva, S., **Ииев, I.**, Marinov, P. A small-scale method of sample preparation suitable for simultaneous HPLC-UV assay of capecitabine and its 5'-DFCR metabolite in mouse blood plasma. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2022, 58: e201043, ISSN: 1984-8250, **IF: 1.300, Q2**

### Резюме

Целта на изследването беше да се разработи лесен, евтин, ефективен и безопасен метод за подготовка на проби в малък мащаб, подходящ за едновременно изследване с високоефективна течна хроматография (HPLC) и ултравиолетова (UV) област на капецитабин и неговия 5'-деокси-5-флуороцитидин (5'-DFCR) метаболит в кръвна плазма на мишки. Пригодността на предложения метод за подготовка на проби беше потвърдена чрез оптималната ефективност и ефикасност, постигнати в цялостния аналитичен работен процес. Хроматографското разделяне на капецитабин и първия му метаболит беше

извършено на колона Hypersil GOLD aQ с мобилна фаза, състояща се от 1% мравчена киселина, метанол и вода, и протичаше в режим на градиентно елуиране. Липсата на интерфериращи ендogenous компоненти при времената на задържане на всеки анализ беше потвърдена чрез хроматографски анализ на празни матрици, към които бяха добавени съответните стандарти. Беше регистрирана и липсата на тактилен матричен ефект. За първи път беше оценен ефектът на антикоагуланта на вакуумния контейнер върху ефективността на екстракция и на двата анализа. Установено е, че методът е точен, прецизен и специфичен. Очакваната средна ефективност на „екстракция“ е  $\geq 90\%$  за всеки анализ. Долната граница на количествено определяне както за капецитабин, така и за 5'-DFCR е  $0.05 \mu\text{g/mL}$ .

22. Komsa-Penkova, R., Danailova, A., Krumova, S., Georgieva, G., Giosheva, I., Gartcheva, L., **Илев, I.**, Gartchev, E., Kercheva, K., Savov, A., Todinova, S. Altered Thermal Behavior of Blood Plasma Proteome Related to Inflammatory Cytokines in Early Pregnancy Loss. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(15): 8764, ISSN: 1422-0067, **IF: 5.600, Q1**

### Резюме

Ранната загуба на бременност (РЗБ) е сравнително често срещана патология, при която почти 50% от случаите остават идиопатични. В търсене на нови биомаркери, диференциалната сканираща калориметрия (ДСК) се използва интензивно за характеризиране на термодинамичното поведение на кръвната плазма / серумния протеом, при норма и патология. В настоящото изследване за първи път изследваме профилите на денатурация на ДСК на кръвна плазма, получена от пациенти, страдащи от РЗБ, в сравнение със здрави бременни и небременни жени. Анализът на данните показва, че 58% от термограмите на РЗБ се различават значително от тези на здрави бременни жени. Термичната стабилизация на фракция от албумин-асоциирания преход със съпътстващо потискане на основния и засилване на глобулин-асоциирания преход са характерни за калориметричните профили на РЗБ, които биха могли да се използват като нов индикатор за рисковата бременност. Представените резултати предполагат променен състав или междумолекулни взаимодействия на плазмения протеом на жени с РЗБ. Освен това, промените в EPL термограмите корелират с повишените нива в кръвта на тумор некротичен фактор- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) и интерлевкин-6 (IL-6) и по-висока честота на полиморфизма в гена на инхибитора на плазминогенния активатор тип-1 (PAI-1), което предполага експресия на цялостен засилен имуноен отговор. Съпътстващите промени в плазмените термограми потвърждават потенциала на DSC подхода за разграничаване на промените в патологичното състояние на протеома на кръвната плазма.

23. Radoeva, R., Yankova, I., Enchev, B., Karsheva, M., Ivanova, E., **Илев, I.** Polyphenols of grape pomace from local bulgarian variety mavrud. Antioxidant and antitumor effect against breast cancer. Journal of Chemical Technology and Metallurgy, 2022, 57(3): 508-521, ISSN: 1314-7471, **SJR: 0.196, Q3**

### Резюме

Гроздовите джибри са основният страничен продукт на винопроизводството, ценен източник на полифеноли с антимицробен, антиоксидантен и противораков ефект.

Екстрактите от гроздови семки и джибри са от стратегическо значение за разработването на нови терапевтични подходи срещу някои ракови заболявания, включително рак на гърдата. В това проучване е докладван антиоксидантният и противотуморен потенциал на полифенолната фракция от гроздови джибри, получени от винификацията на местния български сорт грозде Мавруд. След екстракция по Сокслет с 50% воден разтвор на етанол, е определено общото съдържание на полифеноли в екстрактите чрез колориметричен метод на Фолин-Чокалтеу. Получените екстракти са характеризирани чрез HPLC-DAD и тяхната антиоксидантна активност е изследвана с DPPH анализ. Цитотоксичният ефект е тестван върху клетъчна линия BALB 3T3, клетъчните линии на рак на гърдата MCF-7 и MDA-MB-231 са избрани за определяне на антипролиферативната активност. Резултатите показват по-високо общо съдържание на полифеноли в джибрите в сравнение с екстрактите от семки и преобладаване на галова киселина, катехин и епигалокатехин. Установена е корелация между антиоксидантната активност и общото съдържание на полифеноли. Изследваните екстракти са имали нисък цитотоксичен ефект, тъй като екстрактите от семена са показали по-силна противотуморна активност в сравнение с екстрактите от джибри и потенциал за лечение на луминален тип А рак на гърдата.

24. Stoichev, S., Danailova, A., **Илев, I.**, Sulikovska, I., Strijkova, V., Mladenova, K., Andreeva, T. Fabrication and Biocompatibility of Layer-by-layer Assembled Composite Graphene Oxide-polysaccharide Microcapsules. *Int. J. BIOautomation*, 2022, 26(3): 225-240, ISSN: 1314-1902, **SJR: 0.159, Q4**

### Резюме

Настоящото изследване е фокусирано върху конструирането и характеризирането на морфологията и биосъвместимостта на полизахаридни многослойни микрокапсули (PMC), съставени от естествени полиелектролити (хитозан/алгинат/хиалуронова киселина), и върху ефекта от включването на графенов оксид (GO) в полимерната матрица. Вмъкването на GO в полимерната матрица е иновативна и все още развиваща се стратегия, използвана за модифициране на свойствата на полиелектролитните микрокапсули. Изработихме редица хибридни GO-полизахаридни многослойни капсули чрез техниката „слой по слой“ върху CaCO<sub>3</sub> ядро, последвано от разлагане на ядрото в меки условия. Хибридни микрокапсули с различен състав бяха конструирани чрез промяна на броя или локализацията на включените GO-слоеве. Установено е, че дебелината на хибридните микрокапсули, оценена чрез атомно-силова микроскопия, намалява след включването на GO нанолитове в полимерната матрица. Анализът на жизнеността и пролиферацията на фибробластите след инкубация с хибриден PMC разкри изразен концентрационно-зависим цитотоксичен и антипролиферативен ефект. Въз основа на резултатите можем да заключим, че хибридните многослойни микрокапсули, изработени от естествени полизахариди и графенов оксид, могат да бъдат използвани за биомедицински приложения.

25. Georgieva, A., Todorova, K., **Илев, I.**, Dilcheva, V., Vladov, I., Petkova, S., Dolashki, A., Velkova, L., Dolashka, P., Toshkova, R. Assessment of the *In Vitro* and *In Vivo* Antitumor Activity of Hemocyanins from *Helix aspersa*, *Helix lucorum*, and *Rapana venosa* in a Graffi Myeloid Tumor Model. *Biomedicines*, 2023, 11(6): 1545, ISSN: 2227-9059, **IF: 3.900, Q1**

## Резюме

Хемоцианините са кислород-транспортни гликопротеини в хемолимфата на някои безгръбначни видове, които са привлекли научен интерес, като потенциални противоракови агенти. Настоящото изследване има за цел да оцени *in vitro* и *in vivo* противораковата активност на хемоцианини, изолирани от *Helix aspersa*, *Helix lucorum* и *Rapana venosa* в модела на миелоиден тумор на Graffi. *In vitro* противотуморната активност на хемоцианините е определена чрез МТТ тест и цитоморфологичен анализ чрез флуоресцентна и трансмисионна електронна микроскопия. *In vivo* ефектите на хемоцианините са изследвани при хамстери, на които е трансплантиран тумор на Graffi. Титрите на серумните антитела срещу тестваните хемоцианини и туморния антиген са определени чрез ELISA. Извършена е хистопатологична оценка на морфологичните характеристики, свързани с противотуморния ефект, имунния отговор и токсичността в някои вътрешни органи. Резултатите от *in vitro* изследванията показват, че тестваните хемоцианини индуцират значителни антипролиферативни и апоптогенни ефекти. *In vivo* изследванията демонстрираха защитен противотуморен ефект, изразяващ се в намалена трансплантируемост, потискане на туморния растеж и метастази, намалена смъртност, удължено време на преживяемост и липса на токсични странични ефекти. Настоящото проучване показва, че противотуморната активност на изследваните хемоцианини се дължи както на имунна стимулация, така и на директни ефекти върху туморните клетки, и те показват своя потенциал като терапевтични средства срещу хематологични злокачествени заболявания.

26. **Пиев, I.**, Tsoneva, I., Nesheva, A., Staneva, G., Robev, B., Momchilova, A., Nikolova, B. Complementary Treatment of Breast Cancer Cells with Different Metastatic Potential with Iscador Qu in the Presence of Clinically Approved Anticancer Drugs. *Current Issues in Molecular Biology*, 2024, 46(11): 12457-12480, ISSN: 1467-3037, **IF: 3.000, Q2**

## Резюме

Екстрактът от европейски имел (Iscador Qu) е изследван от десетилетия, но не е престанал да буди научен интерес. Целта беше да се изследва въздействието на Iscador Qu върху антипролиферативния потенциал на 11 стандартни химиотерапевтични агента върху две клетъчни линии на рак на гърдата: MCF-7 с нисък метастатичен потенциал и MDA-MB-231 с висок метастатичен потенциал и контролна, нетуморогенна клетъчна линия MCF-10A. Използвани са МТТ-анализ, FACS анализ и оцветяване с PI. Най-обещаващите комбинации, действащи срещу клетъчната линия MDA-MB-231, са наблюдавани при едновременно приложение на Iscador Qu (80 µg/mL) и Доцетаксел, с 4-кратно намаление на IC<sub>50</sub>. Антагонистичен ефект е установен при лечение с Цисплатин и Iscador Qu (1,5-кратно увеличение на IC<sub>50</sub>). Отговорът на нискометастатичната клетъчна линия на рак на гърдата MCF-7 към тестваните комбинации е различен в сравнение с високометастатичната. Най-изразеният цитотоксичен ефект е установен при комбинацията от оксалиплатин и Iscador Qu (20 µg/mL) (5,2-кратно намаление на IC<sub>50</sub>). Антагонистичен ефект за линията MCF-7 е наблюдаван, при прилагане на комбинации с олапариб и тамоксифен. Това *in vitro* проучване предлага нови комбинации между Iscador Qu и стандартни химиотерапевтични средства, които са многообещаващи при установяването на терапевтични протоколи за рак на гърдата в сравнение с традиционните монотерапии.

27. Andreeva, T., Rudt, A., Fabian, L., Ayaydin, F., **Iliev, I.**, Jung, O., Barbeck, M., Der, A., Krastev, R., Taneva, S. Control of Cell Adhesion and Growth on Polysaccharide-Based Multilayer Coatings by Incorporation of Graphene Oxide. *Coatings*, 2024, 14(5):570, ISSN: 2079-6412, **IF: 2.800, Q2**

### Резюме

Контролирането на клетъчната адхезия, жизнеспособност и пролиферация върху твърди повърхности е от решаващо значение за успешното имплантиране и правилното функциониране на временни и постоянни медицински изделия. Докато при временните или подвижни импланти, както и при хирургическите инструменти, дори леката клетъчна адхезия води до повишен риск от вторични инфекции, кръвене и други усложнения, добрата клетъчна адхезия и жизнестойност са от съществено значение за бързото заздравяване и успешната интеграция на постоянните импланти. Тази работа е мотивирана от нарастващия интерес към конструирането на биосъвместими и биоразградими покрития за биофункционализация на медицински изделия. Покритията на основата на полизахариди са добре известни със своята биосъвместимост, но не са клетъчно-адхезивни, което възпрепятства приложението им, като покрития за импланти. В това проучване демонстрираме, че включването на един или повече слоеве графенов оксид в многослойни покрития от хиалуронова киселина / хитозан е един от начините за регулиране на степента на неспецифична адхезия и растеж на различни клетки (ендотелни клетки от човешка пъпна вена, HUVEC, и миши ембрионални фибробласти, BALB 3T3). Освен това, демонстрираме, че този подход позволява регулиране на клетъчната адхезия в целия диапазон между напълно предотвратена и силно стимулирана клетъчна адхезия, без да се въвежда системна цитотоксичност. Тези открития могат да допринесат за установяването на нов подход за адаптиране на медицински устройства към клетки и тъкани.

28. Vladimirova, S., Hristova, R., **Iliev, I.** Synthesis, Cytotoxicity and Antiproliferative Effect of New Pyrrole Hydrazones. *Molecules*, 2024, 29(23): 5499, ISSN: 1420-3049, **IF: 4.600, Q1**

### Резюме

Нови пирол-базирани карбохидразид (1) и хидразони (1A–D) бяха синтезирани, характеризирани и подложени на спектроскопски изследвания. Хидразоните бяха получени чрез реакция на пирол-хидразид със заместени пиролови алдехиди. Първоначалният карбохидразид беше приготвен чрез селективна хидразинолиза на получения етилов естер на N-пиролилкарбоксилна киселина. Биологичната активност на новосинтезираните съединения беше изследвана *in vitro* върху панел от туморни и нетуморни клетъчни линии. Миши ембрионални фибробласти BALB 3T3 клон A31 бяха използвани в теста за безопасност (BALB 3T3 NRU-тест). Антипролиферативната активност беше определена върху кератиноцити (HaCaT) и меланомни (SH-4) клетки чрез МТТ-анализ. Тестът за безопасност на съединенията показва ниска цитотоксичност и липса на фототоксичен потенциал. Сред нашите нови пиролови хидразони, 1C беше най-селективен (SI = 3.83), при човешки меланомни клетки и показва много добра антипролиферативна активност (IC<sub>50</sub> = 44.63 ± 3.51 μM). Цитотоксичният ефект на 1C корелира със способността му да индуцира апоптоза и да причинява спиране на клетъчния цикъл в S фазата. Освен това, резултатите

показват, че хидразоните, получени чрез кондензация с  $\beta$ -алдехиди, са по-биоактивни от тези, получени чрез кондензация с  $\alpha$ -алдехиди.

29. Kamenova, K., **Ииев, I.**, Prancheva, A., Tuleshkov, P., Rusanov, K., Atanassov, I., Petrov, P. Hydroxypropyl Cellulose Hydrogel Containing *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* Essential-Oil-Loaded Polymeric Micelles for Enhanced Treatment of Melanoma. *Gels*, 2024, 10(10): 627, ISSN: 2310-2861, **IF: 5.300, Q1**

### Резюме

Етеричното масло от *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (ОЕО) е естествено масло с висок терапевтичен потенциал. За някои приложения обаче все още е необходимо разработването на нови лекаствени форми, за да се подобри бионаличността и стабилността на ОЕО. В това проучване описваме производството на оригинален нанокompatibilen хидроксипропилцелулозен (НРС) физически хидрогел, съдържащ полимерни мицели, заредени с ОЕО, за локално приложение. Концентрацията на основните активни съединения на ОЕО - карвакол и тимол - беше определена с помощта на газова хроматография (GC). ОЕО първо беше капсулиран в мицели Pluronic F127 и след това вграден в НРС гел. Мицеларните и гел формулировки от чисти полимери и системи, съдържащи ОЕО, бяха характеризирани съответно чрез динамично разсейване на светлината (DLS) и реологични измервания. Избраните формулировки бяха оценени за цитотоксичност и антипролиферативна активност. Хидрогелната формула на НРС с мицеларен ОЕО (8% НРС, 2% F127, 1% ОЕО) показва продължително освобождаване на маслото и селективност към SH-4 туморни клетки (*in vitro* модел на меланом).

30. Zaharieva, L., Stoyanova, M., Dimova, V., Genova, T., Antonov, L., Markovski, A., **Ииев, I.**, Andreeva, C. Absorbance measurement for interdisciplinary educational experiment on cytotoxicity. *Physics Education*, 2024, 59(6): 065018, ISSN: 0031-9120, **SJR: 0.523**

### Резюме

Предлагаме мултидисциплинарен образователен експеримент, свързващ знания и умения по физика, биология и информационни технологии, чрез обучение и прилагане на изследователския метод от студентите. От гледна точка на физиката, експериментът се състои в измерване на абсорбцията на светлина, а от гледна точка на биологията, той демонстрира процеса на оценка на цитотоксичността чрез колориметричен метод - тест за поглъщане на неутрално червено *in vitro* (NRU-тест). Тестът позволява да се определи концентрацията на тестваното лекарство, при която се наблюдава 50% цитотоксичност (CC<sub>50</sub> стойности) на клетките. След първоначално излагане на тестваното лекарство, неутралното червено се добавя към клетъчната културална среда, то се абсорбира от живите клетки и впоследствие се освобождава в десорбиращ буфер. Клетъчната културална среда се оцветява, като по-интензивният цвят съответства на по-висока клетъчна жизнестойност, докато разтворът с по-ниска оптична плътност съответства на по-малък брой живи клетки. Концентрацията на неутрално червено (NR) в разтвора се оценява чрез стойността на абсорбцията. Измерваме абсорбцията на NR, като използваме много достъпен образователен спектрометър и сравняваме резултата му с този на професионален четец на микроплаки. Показваме, че образователният спектрометър дава резултат за стойността на

CC<sub>50</sub>, който е в съответствие с приемливите стойности на официалния протокол. Включваме коментар върху резултатите от провеждането на това лабораторно упражнение в един клас от 18-годишни студенти (в последната им година от средното образование). Експериментът може да бъде успешно приложен и в лабораторния практикум на студенти от първи курс в университета.

31. Mihaylova, V., **Iliev, I.**, Vasileva, A., Mazziro, E., Mochona, B., Mateeva, N., Tasheva, D. Synthesis and Evaluation of the Antiproliferative Activity of the Derivatives of 3,5-Diaryl-3,4-dihydro-2H-pyrrole-2-carboxylic Acids. *Molecules*, 2025, 30(7): 1602, ISSN: 1420-3049, **IF: 4.600, Q1**

### Резюме

Метаболитният цикъл на L-пролин играе решаваща роля в оцеляването, пролиферацията и метастазите на раковите клетки. Ключов междинен продукт в биосинтеза и разграждането на пролин е 3,4-дихидро-2H-пирол-2-карбоксилна киселина. Директен път за синтезиране на заместени производни на тази киселина включва циклизация на 2-амино-5-оксонитрили. Присъединяването по метода на Михаел на [(дифенилметил)амино]ацетонитрил към енони в основна среда - или с натриев хидроксид, или при условия на фазов трансфер твърдо-течно състояние, използвайки СаО като основа - позволява синтеза на заместени 2-амино-5-оксонитрили като единични диастереоизомери или като диастереоизомерни смеси. Селективното отстраняване на дифенилметил-защитната група, последвано от *in situ* циклизация в киселинни условия, води до транс- и цис-3,5-диарил-3,4-дихидро-2H-пирол-2-карбонитрили. Реакцията на нитрили с HCl / диоксан / метанол, последвана от третиране с вода, води до образуването на естери и амиди, като странични продукти. *In vitro* скринингът на синтезираните съединения срещу множество човешки ракови клетъчни линии разкри, че някои съединения проявяват добър или висок индекс на селективност. В заключение, представените синтетични схеми предлагат прости и ефикасни пътища за получаване на производните на заместени 3,4-дихидро-2H-пирол-2-карбоксилни киселини, като някои съединения проявяват обещаваща антипролиферативна активност.

32. Vilhelmova-Ilieva, N., Nenova, R., Kalinov, K., Dobрева, A., **Iliev, I.** Anti-Herpes Simplex Virus Type 1 Activity of Rosa damascena Mill Essential Oil and Floral Water in Retinal Infection *In Vitro* and *In Silico*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2025, 26(15): 7521, ISSN: 1422-0067, **IF: 4.900, Q1**

### Резюме

Напоследък етеричното розово масло и розовите продукти имат все по-голямо приложение в козметиката, хранително-вкусовата промишленост и в състава на лекарствени продукти. В това проучване изследвахме *in vitro* антивирусната активност на етерично масло и флорална вода от *Rosa damascena* Mill срещу инфекция с вируса на херпес симплекс тип 1 (HSV-1), при заешки ретинални клетки (RRCs). Съставът на основните химични компоненти в етеричното розово масло беше определен чрез газово-хроматографски анализ. Ефектът върху цикъла на вирусна репликация беше определен с помощта на инхибиторния анализ на цитопатичния ефект (CPE). Вируцидната активност, ефектът върху етапа на адсорбция на вируса към клетката гостоприемник и защитният ефект върху

здравите клетки бяха оценени с помощта на метода на крайно разреждане. Ефектите бяха определени като отклонение във вирусния титър ( $\Delta I_g$ ), за третираните клетки от този за нетретираната вирусна контрола. Идентифицираните основни активни компоненти на розовото масло са гераниол (28.73%), цитронелол (21.50%), нонадекан (13.13%), нерол (5.51%), хенейкозан (4.87%), нонадецен (3.93%), хептадекан (2.29%), фарнезол (2.11%), трикозан (1.29%), ейкозан (1.01%) и евгенол (0.85%). Резултатите показват, че и двата розови продукта нямат значителен ефект върху репликацията на вируса, но директно влияят на вирусните частици и намаляват вирусния титър с  $\Delta I_g = 3.25$  за флоралната вода и с  $\Delta I_g = 3.0$  за етеричното масло. Наблюдавано е и значително инхибиране на етапа на вирусна адсорбция, което води до намаляване на вирусните титри с  $\Delta I_g = 2.25$  за флоралната вода и с  $\Delta I_g = 2.0$  за етеричното масло. При предварителна обработка на здрави клетки с розови продукти, и двете проби значително ги предпазиха от последваща инфекция с HSV-1. Този защитен ефект беше по-изразен за маслото ( $\Delta I_g = 2.5$ ) в сравнение с този за флоралната вода ( $\Delta I_g = 2.0$ ). Използвахме метода на молекулярно свързване *in silico*, за да получим представа за механизма на възпрепятстване на вирусната адсорбция от основните съединения на розовото масло (гераниол, цитронелол, нерол). Тези компоненти бяха насочени към повърхността за взаимодействие на gD на HSV-1 с рецепторите на нектин-1 и HVEM (Herpesvirus Entry Mediator) на клетките гостоприемници, съответно в N-, C- и N-края. Тези открития биха могли да осигурят структурна рамка за по-нататъшно разработване на анти-HSV-1 терапии.

33. Vladimirova, S., Hristova, R., **Iliev, I.** Novel methyl-substituted pyrrole hydrazones as selective melanoma agents. *Current Research in Biotechnology*, 2025, 10: 100354, ISSN: 2590-2628, **IF: 4.000, Q2**

## Резюме

Меланомът представлява най-агресивната форма на рак на кожата, произлизащ от меланоцити - клетките, произвеждащи пигмент, разположени в епидермиса. Ефективното лечение на меланома остава основно клинично предизвикателство, до голяма степен поради способността му за избягване на имунната защита, бързо метастатично разпространение и развитие на резистентност към терапевтични интервенции. Въз основа на нашите предварително разработени съединения с висока селективност към клетъчната линия SH-4 на меланома, ние създадохме нова серия съединения, в които заменихме халогенния атом с метилова група в прекурсора, пирол-базиран карбохидразид 2. Всички производни хидразони (2A-D) бяха синтезирани чрез кондензация на карбохидразид 2 с различни заместени пиролови алдехиди, впоследствие характеризирани и подложени на подробен спектроскопски анализ. *In vitro* оценката на тези новоразработени съединения беше извършена върху разнообразен набор от ракови и неракови клетъчни линии, за да се определят техните биологични ефекти. Профилът на безопасност беше установен с помощта на BALB 3T3 NRU-анализ с миши ембрионални фибробласти (BALB 3T3 клон A31), разкривайки минимална цитотоксичност и липса на фототоксични ефекти. Антипролиферативните ефекти бяха количествено определени в кератиноцити (HaCaT) и меланомни (SH-4) клетки, използвайки МТТ анализ. От особено значение е, че съединение

2C се очертава като най-селективния агент ( $SI = 5.51$ ), при човешки меланомни клетки, показвайки значителна антипролиферативна активност ( $IC_{50} = 31.93 \pm 2.59$ ). По-нататъшни изследвания разкриха, че цитотоксичното действие на 2C се медира от индуцирането на клетъчно натрупване във фазата S/G2. В съответствие с нашите предишни изследвания, настоящите резултати допълнително потвърждават, че хидразоните, синтезирани чрез кондензация с  $\beta$ -алдеhide, показват повишена биоактивност в сравнение с тези, получени от  $\alpha$ -алдеhide.