

РЕЗЮМЕТА

на научните трудове на български и на английски език на
на Доц. Йоана Димитрова Киселова-Кънева, дб
за участие в конкурс за „професор“
в област на висшето образование 4 Природни науки, математика и информатика,
професионално направление 4.3 Биологически науки,
специалност **Биохимия**

A1. Дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „доктор“

1. **Киселова-Кънева Й**, Проучване на антиоксидантната активност на български лечебни растения. МУ-Варна; 2011.

Резюме

В настоящото проучване е изследвана *in vitro* антиоксидантната активност и съдържанието на полифеноли на екстракти и фракции от 54 лечебни растения, които се прилагат в българската народна медицина. От анализа на получените резултати е избран един вид растение, чийто екстракт да бъде проучен за антиоксидантна и противовъзпалителна активност при експерименти с клетъчни култури и модели с опитни животни. Изследвано е влиянието на екстракт от *Agrimonia eupatoria* в преадипоцитна (3T3-L1) и макрофжна (J774A.1) клетъчна култура върху клетъчната жизнечестота и експресията на гени, свързани с антиоксидантната защита и възпалението в модел на индуциран оксидативен стрес. В експериментален модел с обременяване с фруктоза с цел предизвикване на метаболитни нарушения при плъхове, е изследван ефектът на приема на воден екстракт от *Agrimonia eupatoria* върху маркери за оксидативен статус в серум и тъканни хомогенати, а също така и върху експресията на гени в мастна тъкан.

Abstract

In the present study, the *in vitro* antioxidant activity of extracts and fractions from 54 medicinal plants used in Bulgarian folk medicine was investigated. Based on the analysis of the obtained results, one plant species was selected and its extract was studied for antioxidant and anti-inflammatory activity in cell culture experiments and experimental animal models. The effect of *Agrimonia eupatoria* extract was studied in preadipocyte (3T3-L1) and macrophage (J774A.1) cell

culture on cell viability and on expression of genes related to antioxidant defense and inflammation in models of induced oxidative stress. In an experimental model of fructose overload to induce metabolic disorders in rats, the effect of the intake of an aqueous extract of *Agrimonia eupatoria* on markers of oxidative status in serum and tissue homogenates and also on gene expression in adipose tissue was investigated. Obtained data

В4. Представени са публикации, еквивалентни на монография/хабилитационен труд

В.4.1 Kiselova-Kaneva Y, Galunska B, Nikolova M, Dincheva I, Badjakov I. High resolution LC-MS/MS characterization of polyphenolic composition and evaluation of antioxidant activity of *Sambucus ebulus* fruit tea traditionally used in Bulgaria as a functional food. Food Chem. 2022;367:130759.

Abstract

The purpose of this study was to perform phytochemical analysis of tea from *Sambucus ebulus* fruits concerning hydroxycinnamic acids, flavonol glucosides, stilbenes and proanthocyanidin mono-, di- and trimers content. In total, 33 compounds were identified and quantified using UPLC-DAD-ESI/MS/MS system and the results are presented in mg/g dry weight (DW). Among analyzed hydroxycinnamic acids, 5-Caffeoylquinic acid (114.17 mg/g) was most abundant, followed by 3-*p*-Coumaroylquinic acid (50.33 mg/g) and 3-*p*-Feruloylquinic acid, *p*- Coumaric acid glucoside and 4-*p*-Coumaroylquinic acid (31.36 mg/g, 29.78 mg/g and 27.70 mg/g, respectively). Flavonol glucosides were represented predominantly by Quercetin-3-O-galactoside, Quercetin-3-O-rhamnosyl-galactoside Quercetin-3-O-glucoside and Quercetin-3-O-rhamnosyl-glucoside (3.68 mg/g, 3.22 mg/g, 2.87 mg/g and 2.56 mg/g, respectively). *trans*-Resveratrol-3-O-glucoside, epicatechin (40.62 mg/g) and proanthocyanidin di- and –trimers (19.90 mg/g – 31.42 mg/g) also were present in the tea. ABTS cation decolorization assay revealed 1.248 mM UAE activity and the percent of DPPH radical scavenging was 14.25%, corresponding to 39.07 μM Trolox equivalents

Резюме

Целта на това проучване е да се извърши фитохимичен анализ на чай от плодовете на *Sambucus ebulus* относно съдържанието на хидроксиканелени киселини, флавонолови

гликозиди, стилбени и проантоцианидинови моно-, ди- и тримери. Общо 33 съединения бяха идентифицирани и количествено определени с помощта на UPLC-DAD-ESI/MS/MS система и резултатите са представени в mg/g сухо тегло (DW). Сред анализираниите хидроксиканелови киселини, 5-кафеоилхининова киселина (114,17 mg/g) е с най-висока концентрация, следвана от 3-р-кумароилхининова киселина (50,33 mg/g) и 3-р-ферулоилхининова киселина, р-кумарова киселина глюкозид и 4-р-Кумароилхининова киселина (31,36 mg/g, 29,78 mg/g и 27,70 mg/g, съответно). Флавоноловите гликозиди са представени предимно от кверцетин-3-О-галактозид, кверцетин-3-О-рамнозил-галактозид, кверцетин-3-О-глюкозид и кверцетин-3-О-рамнозил-глюкозид (3,68 mg/g, 3,22 mg/g, 2,87 mg/g и 2,56 mg/g, съответно). Транс-ресвератрол-3-О-глюкозид, епикатехин (40,62 mg/g) и проантоцианидинови ди- и –тримери (19,90 mg/g – 31,42 mg/g) също присъстват в чая. Анализът чрез ABTS катион обезцветяващ метод показва 1,248 mM UAE активност, а процентът на DPPH радикалово обезвреждане е 14,25%, съответстващо на 39,07 µM Trolox еквиваленти.

B4.2. Tasinov O, Dincheva I, Badjakov I, **Kiselova-Kaneva Y**, Galunska B, Nogueiras R, Ivanova D. Phytochemical Composition, Anti-Inflammatory and ER Stress-Reducing Potential of *Sambucus ebulus* L. Fruit Extract. *Plants*. 2021;10(11):2446.

Abstract

Sambucus ebulus L. (SE) fruits are used for their immunostimulation, hematopoietic and antiviral potential. Recently, we focused on analyzing the mechanism underlying SE fruit aqueous extract's (FAE) immunomodulation and anti-inflammatory activities, with attention to its endoplasmic reticulum (ER) stress-reducing potential. J774A.1 macrophages were treated with SE FAE alone or in conditions of lipopolysaccharides (LPS) stimulation. Using GC-MS and LC-MS/MS, its phytochemical composition was analyzed. To measure transcription and protein levels, we used qPCR and Western blot, respectively. The prevailing phytochemicals in SE FAE were hydroxycinnamic acids, proanthocyanidins and anthocyanins. The content of some amino acids, organic acids, alcohols, fatty acids and esters were newly reported. Extracts exerted an immunostimulation potential by stimulating IL-6, TNF α , Ccl2, COX2 and iNOS transcription, without inducing ER stress. SE FAE suppressed the LPS-induced transcription of inflammation related genes (IL-1 β , IL-6, TNF α , Ccl2, Icam-1, Fabp4, COX2, iNOS, Nox1, IL-1ra, Sirt-1) and

reduced the protein levels of iNOS, p ϵ IF2 α , ATF6 α and CHOP. The effects were comparable to that of salicylic acid. SE suppresses LPS-stimulated inflammatory markers on the transcription and translation levels. Targeting ER stress is possibly another mechanism underlying its anti-inflammatory potential. These findings reveal the potential of SE fruits as a beneficial therapeutic of inflammation and ER stress-related pathological conditions.

Резюме

Плодовете на *Sambucus ebulus* L. (SE) се използват заради техния имуностимулиращ, хемopoетичен и антивирусен потенциал. Наскоро се съсредоточихме върху анализирането на механизма, който е в основата на имуномодулацията и противовъзпалителните активности на водния екстракт от плод на SE (FAE), като обърнахме внимание на неговия потенциал за намаляване на стреса в ендоплазмения ретикулум (ER). J774A.1 макрофаги бяха третирани само със SE FAE или в условия на стимулация с липополизахариди (LPS). Фитохимичният състав на SE FAE беше анализиран чрез GC-MS и LC-MS/MS. За измерване на нивата на транскрипция и протеини използвахме съответно qPCR и Western blot. Преобладаващите съединения в SE FAE са хидроксиканелени киселини, проантоцианидини и антоцианини. Екстрактите проявяват имуностимулиращ потенциал чрез стимулиране на транскрипцията на IL-6, TNF α , Ccl2, COX2 и iNOS, без да предизвикват ER стрес. SE FAE потиска LPS-индуцираната транскрипция на свързани с възпаление гени (IL-1 β , IL-6, TNF α , Ccl2, Icam-1, Fabp4, COX2, iNOS, Noxo1, IL-1ra, Sirt-1) и намалява нивата на протеина на iNOS, p ϵ IF2 α , ATF6 α и CHOP. Ефектите са сравними с тези на салициловата киселина. SE потиска LPS-стимулираните възпалителни маркери на нивата на транскрипция и транслация. Таргетирането на ER стресът вероятно е друг механизъм, който е в основата на противовъзпалителния потенциал на SE. Тези констатации разкриват потенциала на SE плодовете като благоприятно средство за лечение на възпаления и патологични състояния, свързани със стреса в ER.

B4.3 Vankova D, Todorova M, **Kisselova-Kaneva Y**, Galunska B. Development of new and robust LC-MS method for simultaneous quantification of polyphenols from *Sambucus ebulus* fruits. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 2019;42(13-14):408-416.

Abstract

A new and simple LC-MS method for analysis of flavonoids from *Sambucus ebulus* berry extracts was developed and validated. Successfully were quantitated seven polyphenols: epicatechin, epigallocatechin gallate, rutin, resveratrol, myricetin, quercetin, and kaempferol. Two detectors, working in parallel, were used: photodiode-array and single quadrupole mass-detector. The mass detection was used for identification and quantification of the analytes, while the diode-array detector was as confirmation tool. The following m/z were tracked: 457.15 (epigallocatechin gallate); 289.06 (epicatechin); 609.13 (rutin); 227.05 (resveratrol); 317.0 (myricetin); 301.02 (quercetin); 285.02 (kaempferol). For optimization the chromatographic separation three wavelengths 205 nm, 305 nm, 272 nm were monitored. The method was capable to detect in one run compounds with no UV or fluorescence chromophore and with very similar structures, such as plant polyphenols. The linearity was from 0.05 mg/L to 50 mg/L (R² 0.9962–0.9987). The recoveries for all tested analytes were between 81.6% and 104.7%. The method was applied for analysis of crude extract of *Sambucus ebulus* ripe fruits. Three major polyphenols – epicatechin (0.84 mg/100gFW), quercetin (0.15 mg/100gFW) and kaempferol (0.05 mg/100gFW) were identified and quantified. The proposed method could be successfully used for routine analysis of epigallocatechin gallate, epicatechin, rutin, resveratrol, myricetin, quercetin, and kaempferol in *Sambucus ebulus* extracts.

Резюме

Беше разработен и валидиран нов и опростен LC-MS метод за анализ на флавоноиди от екстракти от плодове на *Sambucus ebulus*. Успешно бяха количествено определени седем полифенола: епикатехин, епи-галокатехин галат, рутин, ресвератрол, мирицетин, кверцетин и кемпферол. Използвани са два паралелно работещи детектора: фотодиодна матрица и единичен квадруполен масов детектор. Масовото откриване беше използвано за идентифициране и количествено определяне на анализите, докато детекторът с диодна матрица беше като инструмент за потвърждение. Бяха проследени следните m/z: 457.15 (еpigал-локатехин галат); 289.06 (епикатехин); 609.13 (рутин); 227.05 (ресвератрол); 317.0 (мирицетин); 301.02 (кверцетин); 285.02 (кемпферол). За оптимизиране на хроматографското разделяне бяха наблюдавани три дължини на вълната 205 nm, 305 nm, 272 nm. Методът е в състояние да открие в един цикъл съединения без UV или флуоресцентен хромофор и с много сходни структури, като растителни полифеноли. Линейността беше от 0,05 mg/L до 50 mg/L (R² 0,9962–0,9987). Методът е приложен за

анализ на свеж екстракт от зрели плодове на *Sambucus ebulus*. Три основни полифенола – епикатехин (0,84 mg/100gFW), кверцетин (0,15 mg/100gFW) и кемпферол (0,05 mg/100gFW) бяха идентифицирани и количествено определени. Предложеният метод може успешно да се използва за рутинен анализ на епигалокатехин галат, епикатехин, рутин, ресвератрол, мирицетин, кверцетин и кемпферол в екстракти от *Sambucus ebulus*.

B4.4 Tasinov O, Kiselova-Kaneva Y, Nazifova-Tasinova N, Todorova M, Trendafilova A, Ivanova D. Chemical composition and cytoprotective and anti-inflammatory potential of *Sambucus ebulus* fruit ethyl acetate fraction. *Bulgarian Chemical Communications*, 2020;52(Special Issue D):100-106.

Abstract

Sambucus ebulus (SE) fruits are used in traditional medicine for immunostimulation and treatment of gastrointestinal disorders. We examined the anti-inflammatory potential of SE fruit ethyl acetate fraction (EAF) on a cell model of ethanol-induced cytotoxicity of 3T3-L1 preadipocytes. After fractionation the total polyphenol content (TPC) using FolinCiocalteu reagent and total antioxidant capacity (TAC) by ABTS+ decolorization assay of SE fruit extract and fractions were measured. By thin-layer chromatography, the presence of selected polyphenols was analysed. Cell viability was tested using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide reduction assay. Cells were treated with SE EAF dissolved in ethanol or ethanol only. Transcription levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL6), cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLc) were measured using qPCR. Relative transcription levels were calculated using $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. SE EAF exhibited the highest TPC and TAC among the analysed extracts. For the first time the presence of hyperoside, isoquercetin, isorhamnetin-3-O- β -glucopyranoside and traces of rutin and of 3,5-dicaffeoylquinic acid are reported for the SE EAF. SE EAF showed a cytoprotective effect, by increasing the ethanol-suppressed cell viability up to 2.4 times ($p < 0.001$). Treatment with SE EAF (0.02% w/v) decreased ethanol-induced iNOS, COX-2, TNF- α and GCLc gene expression by 63% ($p < 0.01$), 54% ($p < 0.001$), 64% ($p < 0.01$) and 65% ($p < 0.05$), respectively, indicating anti-inflammatory potential of the fruit extract. Lower concentration (0.01% w/v) of SE EAF decreased IL-6 and GCLc gene expression by 71% ($p < 0.01$) and 45% ($p < 0.05$), respectively. This study

provides first scientific evidences about the cytoprotective and anti-inflammatory potential of SE fruit EAF.

Резюме

Плодовете на *Sambucus ebulus* (SE) се използват в традиционната медицина за имуностимулиране и лечение на стомашно-чревни заболявания. Ние изследвахме противовъзпалителния потенциал на SE етилацетатна фракция (EAF) от плодовете върху клетъчен модел на индуцирана от етанол цитотоксичност при 3T3-L1 преадипоцити. След фракциониране е измерено общото съдържание на полифенол (TPC) с помощта на FolinCiocalteu реактив и общият антиоксидантен капацитет (ТАС) чрез ABTS+ обезцветяващ метод. Чрез тънкослойна хроматография е анализирано наличието на избрани полифеноли. Клетъчната жизнеспособност беше тествана с помощта на метод, отчитащ способността за редукция на 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид. Клетките бяха третирани със SE EAF, разтворен в етанол или само в етанол. Нивата на транскрипция на тумор некротизиращ фактор-алфа (TNF- α), интерлевкин-6 (IL6), циклооксигеназа-2 (COX-2), индуцируема азотен оксид синтаза (iNOS) и каталитична субединица на глутамат-цистеин лигазна (GCLc) бяха измерени с помощта на qPCR. Относителните нива на транскрипция бяха изчислени с помощта на $2^{-\Delta\Delta Ct}$ метод. SE EAF показва най-високите TPC и TAC сред анализиранияте екстракти. За първи път се съобщава за наличие на хиперозид, изокверцетин, изорамнетин-3-O- β -глюкопиранозид и следи от рутин и 3,5-дикафеоилхининова киселина за SE EAF. SE EAF показва цитопротективен ефект, като увеличава потиснатата от етанол клетъчна жизнеспособност до 2,4 пъти ($p < 0,001$). Третирането със SE EAF (0,02% w/v) намалява индуцираната от етанол iNOS, COX-2, TNF- α и GCLc гена експресия с 63% ($p < 0,01$), 54% ($p < 0,001$), 64% ($p < 0,01$) и 65% ($p < 0,05$), съответно, което показва противовъзпалителен потенциал на плодовия екстракт. По-ниската концентрация (0,01% w/v) на SE EAF намалява експресията на гена на IL-6 и GCLc със 71% ($p < 0,01$) и 45% ($p < 0,05$), съответно. Това проучване предоставя първите научни доказателства за цитопротективния и противовъзпалителния потенциал на EAF от плодове на SE.

B4.5 Todorova M, Tasinov O, Pasheva M, Vankova D, Ivanova D, Galunska B, **Kiselova-Kaneva Y.** Cytoprotective activity of *Sambucus ebulus* fruit extracts in conditions of oxidative tert-buthyl-

hydroperoxyde induced cell toxicity. Bulgarian Chemical Communications, 2019;51(Special Issue A):125 – 130

Abstract

Dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.) is a popular herb in Bulgarian folk medicine known for its antiseptic, antiinflammatory and diuretic effect. *Sambucus* sp. berries are rich in bioactive compounds, most abundant of them being polyphenols, and particularly anthocyanins. The aim of the present study was to evaluate *in vitro* proliferative and cellprotective potential of SE extract and its hydrophilic and anthocyanin enriched fraction in conditions of t-ButOOH induced cell death on J774A.1 macrophage cell line. Total extract (TE) and its hydrophilic (HF) and anthocyanin fraction (AF) were analyzed *in vitro* for their polyphenol, flavonoid and anthocyanin content, and antioxidant capacity. Cytoprotective activity of these preparations was assessed in a model of t-ButOOH induced cytotoxicity. TE, HF and AF were tested in different concentrations (0.5-64%, v/v). The lowest applied HF concentration (0.5% v/v) caused a 6% significant increase in the cell viability. All the other samples caused a gradual decrease in the cell viability. In order to measure their protective activity, extract (0.5%, 2%, 8% and 32%, (v/v)) were applied as pretreatment. Significant improvement in cell viability of t-ButOOH treated cells was detected for all of the extracts, however the most prominent effect was found for the TE, followed by HF and AF. TE significantly improved cell viability by 116, 230, 1165 and 1767%, respectively. Lower, but similar was the effect of the hydroxyl and anthocyanin fraction where improvement of cell viability was up to 564% and 300%. Pretreatment with *Sambucus ebulus* total extract and its hydrophilic and anthocyanin fractions protects J774A.1 cells in a model of t-ButOOH induced cytotoxicity.

Резюме

Бъзакът (*Sambucus ebulus* L.) е популярна билка в българската народна медицина, известна със своето антисептично, противовъзпалително и диуретично действие. Плодовете на *Sambucus* sp. са богати на биоактивни съединения, най-много от които са полифеноли и особено антоцианини. Целта на настоящото проучване е да се оцени *in vitro* пролиферативния и цитопротективен потенциал на екстракт от SE и неговата хидрофилна и обогатена с антоцианини фракция в условия на клетъчна смърт, индуцирана от t-ButOOH при макрофажна клетъчна линия J774A.1. Общият екстракт (TE) и неговата хидрофилна (HF) и антоцианинова фракция (AF) бяха анализирани *in vitro* за тяхното съдържание на

полифеноли, флавоноиди и антоцианин и антиоксидантен капацитет. Цитопротективната активност на тези препарати беше оценена в модел на индуцирана от t-ButOОН цитотоксичност. ТЕ, HF и AF са тествани в различни концентрации (0,5-64%, v/v). Най-ниската приложена концентрация на HF (0,5% v/v) причинява 6% значително увеличение на жизнеспособността на клетките. Всички останали проби предизвикват постепенно намаляване на жизнеспособността на клетките. За да се измери тяхната защитна активност, екстрактите (0,5%, 2%, 8% и 32%, (v/v)) се прилагат като претретиране. Значително подобрене в клетъчната жизнеспособност на третираните с t-ButOОН клетки е установено за всички екстракти, но най-изявения ефект се забелязва за ТЕ, следван от HF и AF. ТЕ значително подобрява жизнеспособността на клетките съответно със 116, 230, 1165 и 1767%. По-нисък, но подобен е ефектът на хидроксилната и антоцианиновата фракция, където подобряването на жизнеспособността на клетките е до 564% и 300%. Предварителното третиране с общ екстракт от *Sambucus ebulus* и неговите хидрофилни и антоцианинови фракции имат протективно действие върху клетките J774A.1 в модел на индуцирана от t-ButOОН цитотоксичност.

B4.6 Tasinov O, Kiselova-Kaneva Y, Ivanova D. Effects of dwarf elder fruit infusion on nuclear factor kappa B and glutathione metabolism-related genes transcription in a model of lipopolysaccharides challenged macrophages. Bulgarian Chemical Communications, 2020;52(Special Issue D):68-74.

Abstract

Sambucus ebulus L. (SE) is shown to be implicated in combating oxidative stress in inflammation and cell death. We aimed to analyse the effect of SE fruit aqueous infusion (FAI) in a model of lipopolysaccharides (LPS)-induced cytotoxicity in J774A.1 mouse macrophages. Transcription levels of NF- κ B, antioxidant enzymes glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit (GCLc) and glutathione peroxidase (GPx) were analysed. Cell viability tests showed that LPS (25-200 ng/mL) caused gradual cell death by up to 14.5%, whereas SE FAI (0.625%-12.5% in culture media) was nontoxic. Salicylic acid (SA) as a positive control (25-200 μ M) gradually induced cell proliferation by up to 15%. Real-Time PCR analysis revealed that SE FAI alone significantly up-regulated NF- κ B, GPx and GCLc mRNA levels (3.8, 3.04 and 9.57-fold, respectively). Pre-treatment with SE

FAI significantly reduced LPS (200 ng/mL)-stimulated transcription of NF- κ B and GPx by 70%, and GCLc by 37%. The effect of SE FAI/+LPS was similar to the effect of SA/+LPS. NF- κ B mRNA levels significantly correlated with those of GCLc ($r=0.66$), and GPx ($r=0.79$). We conclude that SE FAI may exhibit its anti-inflammatory and antioxidant effects by altering transcription of LPS-stimulated oxidative stress and inflammation related genes.

Резюме

Доказано е, че *Sambucus ebulus* L. (SE) може да доринесе в предотвратяване на оксидативния стрес при възпаление и клетъчна смърт. Имахме за цел да анализираме ефекта на водна инфузия от плодове на SE (FAI) в модел на индуцирана от липополизахариди (LPS) цитотоксичност в J774A.1 миши макрофаги. Анализирани са нивата на транскрипция на NF- κ B, антиоксидантните ензими глутамат-цистеин лигаза, каталитична субединица (GCLc) и глутатион пероксидаза (GPx). Тестовите за клетъчна жизнестойкост показват, че LPS (25-200 ng/mL) причинява клетъчна смърт с до 14,5%, докато SE FAI (0,625%-12,5% в културална среда) е нетоксичен. Салициловата киселина (SA) като положителна контрола (25-200 μ M) индуцира постепенно клетъчна пролиферация с до 15%. PCR анализът в реално време показва, че самостоятелно SE FAI значително повишава нивата на иРНК за NF- κ B, GPx и GCLc (съответно 3,8, 3,04 и 9,57 пъти). Предварителното третиране със SE FAI значително намалява LPS (200 ng/mL)-стимулираната транскрипция на NF- κ B и GPx със 70%, и GCLc с 37%. Ефектът на SE FAI/+LPS е подобен на ефекта на SA/+LPS. Нивата на NF- κ B иРНК значително корелират с тези на GCLc ($r=0,66$) и GPx ($r=0,79$). В заключение, SE FAI може да прояви своите противовъзпалителни и антиоксидантни ефекти чрез промяна на транскрипцията на гени, свързани с LPS-стимулиран оксидативен стрес и възпаление.

Г7. Научни публикации, публикувани в издания, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (Web of Science и Scopus)

Г7.1 Sokrateva T, Roussev B, Nashar M, **Kiselova-Kaneva Y**, Mihaylova G, Todorova M, Pasheva M, Tasinov O, Nazifova-Tasinova N, Vankova D, Ivanova D, Radanova M, Galunska B, Vlaykova T, Ivanova D. Effects of sulphur-containing mineral water intake on oxidative status and markers for inflammation in healthy subjects. Archives of Physiology and Biochemistry, 2021;127(4):327-336.

Abstract

Context: Sulphurous mineral waters (SMW) have a wide range of applications. Sulphur content of mineral waters is considered as possible determinant for their anti-inflammatory or pro-inflammatory effects. **Objective:** To explore the healing properties of Varna basin mineral water by analysing possible anti-oxidative and anti-inflammatory effects. **Materials and methods:** An intervention with Varna SMW intake was performed with healthy volunteers. Total thiols, total glutathione and its fractions, reactive oxygen metabolites, malondialdehyde, intracellular adhesion molecule (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) were measured. Expression of γ -glutamyl-cysteinyl ligase (GCL) and sICAM-1 genes was also analysed. **Results:** A significantly increased total glutathione and total thiols were observed at the end of the intervention. GCL and sICAM-1 gene expressions were increased after the intervention. **Conclusion:** SMW consumption improved redox status of the body. We suggested that these beneficial effects may be attributed to the established high levels of sulphur-containing compounds in Varna mineral water.

Резюме

Контекст: Серните минерални води имат широк спектър от приложения. Съдържанието на сяра в минералните води се счита за възможен определящ фактор за техните противовъзпалителни или провъзпалителни ефекти. **Цел:** Да се изследват лечебните свойства на минералната вода от Варненския басейн чрез анализ на възможните антиоксидантни и противовъзпалителни ефекти. **Материали и методи:** Проведена е интервенция с прием на сяра-съдържаща минерална вода от Варненския басейн от здрави доброволци. Бяха измерени общи тиоли, общ глутатион и неговите фракции, реактивни кислородни метаболити, малондиалдехид, ICAM-1 и VCAM-1. Експресията на γ -глутамил-цистеинил лигаза (GCL) и sICAM-1 гени също беше анализирана. **Резултати:** В края на интервенцията се наблюдава значително повишен общ глутатион и общи тиоли. Експресията на GCL и sICAM-1 генните бяха увеличени след интервенцията. **Заключение:** консумацията на сарасъдържаща минерална вода подобрява редокс статуса в организма. Предполагаме, че тези благоприятни ефекти могат да се дължат на установените високи нива на сярасъдържащи съединения във варненската минерална вода.

Г7.2 Chichova M, Tasinov O, Shkodrova M, Mishonova M, Sazdova I, Ilieva B, Doncheva-Stoimenova D, **Kiselova-Kaneva Y**, Raikova N, Uzunov B, Ivanova D, Gagov H. New Data on Cylindrospermopsin Toxicity. *Toxins*. 2021;13(1):41.

Abstract

Cylindrospermopsin (CYN) is a widely spread cyanotoxin that can occur in fresh water and food. This research aims to investigate CYN toxicity by studying the effects of drinking 0.25 nM of CYN-contaminated water from a natural source, and of the direct application of moderate concentrations of CYN on different animal targets. The chosen structures and activities are rat mitochondria inner membrane permeability, mitochondrial ATP synthase (ATPase) and rat liver diamine oxidase (DAO) activities (EC 1.4.3.22.), the force of the contraction of an excised frog heart preparation with functional innervation, and the viability of a human intestinal epithelial cell line (HIEC-6). The oral exposure to CYN decreased the reverse (hydrolase) activity of rat liver ATPase whereas its short-term, *in vitro* application was without significant effect on this organelle, DAO activity, heart contractions, and their neuronal regulation. The application of CYN reduced HIEC-6 cells' viability dose dependently. It was concluded that CYN is moderately toxic for the human intestinal epithelial cells, where the regeneration of the epithelial layer can be suppressed by CYN. This result suggests that CYN may provoke pathological changes in the human gastrointestinal tract.

Резюме

Цилиндроспермопсин (CYN) е широко разпространен цианотоксин, който може да се появи в прясна вода и храна. Това изследване има за цел да изследва токсичността на CYN чрез изучаване на ефектите от пиенето на 0,25 nM замърсена с CYN вода от естествен източник и от директното прилагане на умерени концентрации на CYN върху различни животински обекти. Подбраните обекти и активности са пропускливостта на вътрешната мембрана на митохондриите на плъхове, активността на митохондриалната АТФ синтаза (АТФаза) и чернодробната диаминооксидаза (DAO) на плъх (EC 1.4.3.22.), силата на съкращението на изрязан препарат от сърце на жаба с функционална инервация, и жизнеспособността на човешка чревна епителна клетъчна линия (HIEC-6). Оралното излагане на CYN намалява обратната (хидролазна) активност на АТФ-аза в черния дроб на плъх, докато краткосрочното му приложение *in vitro* е без значителен ефект върху този органел, DAO

активността, сърдечните контракции и тяхната невронална регулация. Прилагането на CYN намалява жизнеспособността на HIEC-6 клетките в зависимост от дозата. Беше направено заключение, че CYN е умерено токсичен за човешките чревни епителни клетки, където регенерацията на епителния слой може да бъде потисната от CYN. Този резултат предполага, че CYN може да провокира патологични промени в човешкия стомашно-чревен тракт.

Г7.3 Tasinov O, Vankova D, Nazifova-Tasinova N, Pasheva M, **Kiselova Y**, Sokrateva T, Ivanov D, Uzunov B, Stoyneva-Gärtner M, Ivanova D. Cytotoxicity of water from five Bulgarian wetlands contaminated by toxigenic cyanobacteria and cyanotoxins. Bulgarian Chemical Communications. 2020;52(Special Issue D):257-262.

Abstract

Microscopic photosynthetic cyanoprokaryotes/cyanobacteria, or blue-green algae, produce various numbers of bioactive compounds, including different cyanotoxins which are hazardous for the ecosystem and human health. Cyanoprokaryotes are widely spread on the Earth and in Bulgaria specifically, where during the last two decades their toxins were found in different wetlands. However, only few studies conducted in Bulgaria mention cytotoxic effects of waters contaminated with cyanotoxins and up-to-now only three types of cell lines were used in the tests. Therefore, the present study was focused on the cytotoxic effect of waters from five chosen Bulgarian wetlands (two reservoirs and three lakes) with proved development of toxigenic cyanoprokaryotes. Moreover, for the first time in the country, the cytotoxicity was tested on the Hs27 human skin cells line. MTT test was performed to measure the cell viability upon exposure to increasing concentrations of water samples in culture medium. During the study three important results, which generally correspond to the cyanoprokaryote composition, biomass and detected cyanotoxins, were obtained: 1) applied water samples exhibited their effect after 24 hours of exposure; 2) at the lowest concentration of 1% cytotoxic effects were not observed; 3) at concentration of 8% in the culture medium, all water samples decreased cell viability by more than 50% compared to non-treated cells. These results allow to suppose the strong adverse effect of cyanoprokaryotes and their metabolites (mainly cyanotoxins) which should be considered as a risk factor for animal and human health in the studied water bodies.

Резюме

Микроскопичните фотосинтетични цианопрокариоти/цианобактерии или синьо-зелени водорасли произвеждат различен брой биоактивни съединения, включително различни цианотоксини, които са опасни за екосистемата и човешкото здраве. Цианопрокариотите са широко разпространени в целия свят и в частност в България, където през последните две десетилетия техните токсини са открити в различни влажни зони. Въпреки това, само няколко проучвания, проведени в България, споменават цитотоксични ефекти на води, замърсени с цианотоксини и до момента в тестовете са използвани само три вида клетъчни линии. Ето защо настоящото изследване е фокусирано върху цитотоксичния ефект на водите от пет избрани български влажни зони (две водохранилища и три езера) с доказано развитие на токсични цианопрокариоти. Освен това за първи път в страната цитотоксичността беше тествана върху клетъчна линия от човешки кожни клетки Hs27. За измерване на жизнеспособността на клетките при излагане на нарастващи концентрации на водни проби в културална среда е използван МТТ тестът. По време на изследването бяха получени три важни резултата, които най-общо съответстват на състава на цианопрокариотите, биомасата и откритите цианотоксини: 1) приложените водни проби показаха ефекта си след 24 часа експозиция; 2) при най-ниската концентрация от 1% не са наблюдавани цитотоксични ефекти; 3) при концентрация от 8% в културалната среда, всички водни проби намаляват клетъчната жизнеспособност с повече от 50% в сравнение с нетретираните клетки. Тези резултати позволяват да се предположи силното неблагоприятно въздействие на цианопрокариотите и техните метаболити (главно цианотоксини), които трябва да се разглеждат като рисков фактор за здравето на животните и хората в изследваните водоеми.

Г7.4 Hristova M, Tasinov O, Tzaneva M, Chivchibashi D, **Kiselova-Kaneva Y**, Bekyarova G. Effect of melatonin on gastric antioxidant defense in experimental burn trauma. *Veterinari Medicina*. 2022; 67:379–386.

Abstract

Severe burn trauma triggers oxidative gastric mucosal injury. The purpose of this study was to investigate the antioxidant defence mechanisms and protective effect of melatonin in the gastric

mucosa after burn injury. In order to investigate the mechanisms involved in the gastric antioxidant defence in a rat burn model, quantitative real-time PCR and immunohistochemistry techniques were applied. An analysis of glutathione peroxidase 4 (GPx4), glutathione reductase (GR), and catalase (Cat) gene expression was performed along with the evaluation of the gastric Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/Zn SOD) activity. Melatonin was applied immediately and 12 h after 30% of total body surface area burns. The burn injury significantly increased the Gpx4 mRNA ($P < 0.0001$) and Gsr mRNA ($P < 0.0001$) expression. It also had a slight positive effect on the Cat mRNA expression and Cu/Zn SOD activity. Melatonin, in turn, markedly augmented the burn-induced Cu/Zn SOD ($P < 0.0001$) activity, reversed the Gpx4 mRNA ($P < 0.0001$) and Gsr mRNA ($P < 0.0001$) expression, and inhibited the Cat mRNA level. In conclusion, the present study suggests that a burn injury adaptively increases the Cu/Zn SOD activity and enhances the Gpx4 and Gsr gene expression in the gastric mucosa. Melatonin effectively modulates the expression of the cellular antioxidant enzymes, and improves the antioxidant defence by augmenting the Cu/Zn SOD activity.

Резюме

Тежката травма от изгаряне отключва оксидативно увреждане на стомашната лигавица. Целта на това проучване е да се изследват антиоксидантните защитни механизми и защитния ефект на мелатонина в стомашната лигавица след изгаряне. За да се изследват механизмите, включени в стомашната антиоксидантна защита в модел на изгаряне на плъх, беше приложен количествен PCR в реално време и имунохистохимичен анализ. Беше извършен анализ на генната експресия на глутатион пероксидаза 4 (GPx4), глутатион редуктаза (GR) и каталаза (Cat) заедно с оценката на активността на стомашната Cu/Zn супероксид дисмутаза (Cu/Zn SOD). Мелатонинът беше прилаган незабавно и 12 часа след изгаряне на 30% от общата повърхност на тялото. Изгарянето значително повишава експресията на Gpx4 иРНК ($P < 0.0001$) и Gsr иРНК ($P < 0.0001$). То имаше и слаб положителен ефект върху експресията на Cat иРНК и активността на Cu/Zn SOD. Мелатонинът, от своя страна, значително усилва индуцираната от изгаряне активност на Cu/Zn SOD ($P < 0.0001$), намалява експресията на Gpx4 иРНК ($P < 0.0001$) и Gsr иРНК ($P < 0.0001$) и намалява нивото на иРНК за Cat. В заключение, настоящото проучване предполага, че изгарянето адаптивно повишава активността на Cu / Zn SOD и повишава

експресията на Gpx4 и Gsr гените в стомашната лигавица. Мелатонинът ефективно модулира експресията на клетъчните антиоксидантни ензими и подобрява антиоксидантната защита чрез увеличаване на активността на Cu/Zn SOD.

Г7.5 Tasinov O, **Kiselova-Kaneva Y**, Ivanova D, Pasheva M, Vankova D, Ivanova D. Ferrum phosphoricum D12 Treatment Affects J774A.1 Cell Proliferation, Transcription Levels of Iron Metabolism, Antioxidant Defense, and Inflammation-related Genes. Homeopathy. 2022;111(2):113-120. DOI: 10.1055/s-0041-1731312.

Abstract

Background Ferrum phosphoricum (FP) is prescribed as a homeopathic remedy to treat the early stages of fever and inflammation in cases of colds or flu, muscle fatigue and anemia. We aimed to analyze the molecular mechanisms of action of FP D12 on cell proliferation and mRNA expression of iron metabolism, antioxidant defense and inflammation-related genes in mouse J774A.1 macrophages. **Methods** Cell proliferation was examined using the MTT test. RT-qPCR analyses were performed to estimate gene expression changes. Relative gene expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The effect of treatment using FP D12 tablets was compared with that using placebo tablets (PT). **Results** FP D12 in low concentrations (0.0125 mg/mL to 0.025 mg/mL) significantly stimulated proliferation of J774A.1 cells by up to 11% ($p < 0.01$) versus control untreated cells and by up to 40% ($p < 0.01$) versus PT-treated cells in the respective concentration. FP D12 versus PT induced a significant increase in mRNA expression of ferritin light chain (Ftl1) (by 8-fold, $p < 0.01$), β -2-microglobulin (B2m) (by 2.5-fold, $p < 0.05$) and iron-responsive element binding protein 2 (Ireb2) (by 4-fold, $p < 0.05$), and induced a slight decrease in myosin IE (Myo1e) mRNA expression levels (by 0.4-fold, $p < 0.01$) in macrophages. A highly significant ($r^2 \approx 0.99$, $p < 0.05$) correlation was observed between Ireb2 and B2m transcription levels. Significant stimulation of antioxidant enzyme Gpx-1 (by 1.27-fold, $p < 0.01$) in cells by 0.025 mg/mL FP D12, but a slight decrease (by 0.12-fold, $p < 0.05$) in 0.0125 mg/mL-treated cells, was observed. A significant increase in the gene expression of IL-1 β (by 3.5-fold, $p < 0.05$) in macrophages was also detected. **Conclusion** Ferrum phosphoricum in D12 dilution potentially exhibits iron retention, antioxidant and immunomodulation activities, possibly by modulating transcription levels of related genes in non-stimulated mouse macrophages.

Резюме

Въведение: Ferrum phosphoricum (FP) се предписва като хомеопатично лекарство за лечение на ранните стадии на треска и възпаление в случаи на настинка или грип, мускулна умора и анемия. Имахме за цел да анализираме молекулярните механизми на действие на FP D12 върху клетъчната пролиферация и експресията на иРНК на гени, свързани с метаболизма на желязо, антиоксидантната защита и възпалението в миши J774A.1 макрофаги. **Методи** Клетъчната пролиферация беше изследвана с помощта на МТТ тест. Оценка на промените в генната експресия беше извършена чрез RT-qPCR анализ. Относителните нива на генна експресия бяха изчислени с помощта на метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Ефектът от третирането с FP D12 таблетки е сравнен с този на плацебо таблетки (PT). **Резултати.** FP D12 в ниски концентрации (0,0125 mg/mL до 0,025 mg/mL) значително стимулира пролиферацията на J774A.1 клетки с до 11% ($p < 0,01$) спрямо контролните нетретиранни клетки и с до 40% ($p < 0,01$) спрямо третирани с PT клетки в съответната концентрация. FP D12 спрямо PT индуцира значително повишаване на експресията на mRNA на леката верига на феритин (Ftl1) (с 8 пъти, $p < 0,01$), β -2-микроглобулин (B2m) (с 2,5 пъти, $p < 0,05$) и iron-responsive element binding protein 2 (Ireb2) (с 4 пъти, $p < 0,05$), и индуцира леко намаляване на нивата на експресия на мРНК на миозин IЕ (Myo1e) (с 0.4 пъти, $p < 0,01$) в макрофагите. Наблюдава се силно значима ($r^2 = 0,99$, $p < 0,05$) корелация между нивата на транскрипция на Ireb2 и B2m. Бе наблюдавано значително стимулиране на експресията на антиоксидантния ензим Grx-1 (с 1,27 пъти, $p < 0,01$) в клетки третирани с 0,025 mg/mL FP D12, но леко намаление (с 0,12 пъти, $p < 0,05$) в клетки, третирани с 0,0125 mg/mL . Установено е също значително повишаване на генната експресия на IL-1 β (с 3,5 пъти, $p < 0,05$) в макрофагите. **Заключение** Ferrum phosphoricum в D12 разреждане, приложен в нестимулирани миши макрофаги има ефект на задържане на желязо, антиоксидантна и имуномодулираща активност, вероятно чрез модулиране на нивата на транскрипция на свързани гени.

Г7.6 Sokrateva T, Vankova D, Ivanova D, Wilczyński S, Koleva V, Koleva Y, Enchev D, **KiseloVA-Kaneva Y.** An Organophosphorus Compound and its Physicochemical Characterization, In Silico Metabolite and Macromolecules Interaction Prediction and Cell Culture Testing. Supplement Journal of IMAV. 2021;90-93.

Abstract

Our goal was to examine physicochemical characterization of a synthesized compound 5-Ethyl-5-methyl-4-bromo-2-N-butylamido-2,5-dihydro-1,2-oxaphosphol-2-oxide (Br-oxph-1), to perform *in silico* metabolism prognosis and to test its cytotoxicity and gene expression effects. *In silico* modelling revealed 37 probable metabolites some of them with DNA and protein binding properties. At low concentrations, Br-oxph-1 potentiates cell proliferation and its IC₅₀ is 0.442 mg/mL. Concentration of 0.25 mg/mL caused most prominent effect on GCLc and GPx1 expression causing 8 (p<0.01) and 3 (p<0.001) fold change, respectively.

Резюме

Нашата цел беше да изследваме физикохимичната характеристика на новосинтезирано съединение 5-Етил-5-метил-4-бромо-2-N-бутиламидо-2,5-дихидро-1,2-оксафосфол-2-оксид (Br-oxph-1), прогнозиране *in silico* на неговия метаболизъм и за тестване на неговата цитотоксичност и ефекти върху генната експресия. *In silico* моделирането разкри 37 вероятни метаболита, някои от тях с ДНК и протеин свързващи свойства. При ниски концентрации Br-oxph-1 потенцира клетъчната пролиферация и неговият IC₅₀ е 0,442 mg/mL. Концентрация от 0,25 mg/mL предизвиква най-забележим ефект върху експресията на GCLc и GPx1, причинявайки съответно 8 (p<0,01) и 3 (p<0,001)кратно стимулиране.

Г7.7 Surowiecka J, Olczyk P, Ivanova D, **Kiselova-Kaneva Y**, Komosińska-Vassev K. Analysis of iron content in food supplements in relation to the safety of their use. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*. 2020;77(2):229-239.

Abstract

The objective of the study was to test dietary supplements available on the European market with regard to their iron content. Twenty-nine vitamin and mineral supplements were investigated, with additional assessment of their mass homogeneity. Iron was determined by means of the AAS1 method following microwave mineralization of particular samples. Findings were compared to iron contents declared by producers. Tested supplements were analyzed with regard to the ratio between the amount of iron supplied to the body and the RDA for adults and pregnant women, as well as in view of the number of preparation pieces required to be taken in order to ensure the RDA in the groups included in the research. All preparations were characterized by high mass homogeneity.

The iron content determined in the supplements was different from the values indicated by the producers on the packages. Four supplements did not meet the European requirements concerning acceptable limits of nutrient tolerance stated on the labels. Tolerance for iron value in food supplements indicated by producers on packages varied from RDAs for the studied groups. The dosage recommended by the producer was mostly different from the dosage necessary to meet the requirements for iron RDA in the studied groups.

Резюме

Целта на изследването е да се тестват наличните на европейския пазар хранителни добавки по отношение на съдържанието на желязо. Изследвани са двадесет и девет витаминни и минерални добавки с допълнителна оценка на тяхната хомогенност по маса. Желязото се определя с помощта на метода AAS1 след микровълнова минерализация на конкретни проби. Констатациите са сравнени със съдържанието на желязо, декларирано от производителите. Тестваните добавки са анализирани по отношение на съотношението между количеството желязо, което се доставя на организма и ПДД за възрастни и бременни жени, както и с оглед на броя на препаратите, които трябва да се приемат, за да се осигури ПДД в групи, включени в изследването. Всички препарати се характеризират с висока хомогенност на масата. Съдържанието на желязо, определено в добавките, е различно от стойностите, посочени от производителите върху опаковките. етаб

Г7.8 Todorova M, **Kiselova-Kaneva Y**, Potoroko I, Kalinina I, Ivanova D, Galunska B. Antioxidant activity of taxifolin derived from larch: Synergistic studies. Bulgarian Chemical Communications, 2019;51:172-176.

Abstract

The mechanisms of interactions (synergistic, antagonistic or additive) between synthetic or natural antioxidants used as active ingredients or excipients in a multicomponent mixtures is of great interest for the standardization and optimization of pharmaceutical formulations. The current study aims to evaluate the interactions between the natural antioxidants taxifolin and fucoidan used as excipients in pharmacy. Taxifolin was isolated and purified from Dahurian Larch (*Larix gmelinii*). Fucoidan was isolated from brown algae. The antioxidant capacity of pure taxifolin, fucoidan, and

their combinations was determined using ABTS radical-cation decolorization assay. The type of interaction between the tested antioxidants was defined using isobole methodology. When tested alone, taxifolin revealed higher antioxidant activity than fucoidan. The concentration (1.035%) at which it caused 50% effect was almost three times lower than that of fucoidan (3.2%). Further taxifolin reached its highest ABTS-radical scavenging activity at concentration 0.03%, while fucoidan revealed maximum activity at 1.0%. The type and the strength of interactions between the tested antioxidants with respect to their ABTS radical scavenging activity were evaluated using the combination indexes (CI), calculated for each of the tested taxifolin/fucoidan mixtures. All CI values were less than 1, which indicated a synergistic effect of the tested mixtures. The most pronounced ones was taxifolin/fucoidan = 1:3 (CI = 0.55), followed by taxifolin/fucoidan = 1:1 (CI = 0.66), and taxifolin/fucoidan = 3:1 (CI=0.80). The synergistic antioxidant effect of taxifolin/fucoidan mixtures is important for optimization of pharmaceutical formulations for prevention and treatment of various pathological conditions caused by oxidative damage.

Резюме

Механизмите на взаимодействия (синергични, антагонистични или адитивни) между синтетични или естествени антиоксиданти, използвани като активни съставки или ексципиенти в многокомпонентни смеси, представляват интерес за стандартизирането и оптимизирането на фармацевтичните формулировки. Настоящото проучване има за цел да оцени взаимодействията между естествените антиоксиданти таксифолин и фукоидан, използвани като помощни вещества във фармацията. Таксифолин е изолиран и пречистен от даурска лиственица (*Larix gmelinii*). Фукоидан е изолиран от кафяви водорасли. Антиоксидантният капацитет на чист таксифолин, фукоидан и техните комбинации е определена с помощта на ABTS катион-радикал обезцветяващ метод. Видът на взаимодействието между тестваните антиоксиданти е определен с помощта на изоболна методология. Когато се тества самостоятелно, таксифолинът показва по-висока антиоксидантна активност от фукоидан. Концентрацията (1,035%), при която предизвиква 50% ефект, е почти три пъти по-ниска от тази на фукоидан (3,2%). Още повече, таксифолин достига най-високата си активност за погасяване на ABTS-радикали при концентрация 0,03%, докато фукоидан притежава максимална активност при 1,0%. Видът и силата на взаимодействията между тестваните антиоксиданти по отношение на тяхната активност за улавяне на ABTS радикали бяха оценени с помощта на комбинирания индекс (CI),

изчислени за всяка от тестваните смеси таксифолин/фукоидан. Всички стойности на CI са по-малки от 1, което показва синергичен ефект на тестваните смеси. Най-силно изразен е ефектът при таксифолин/фукоидан = 1:3 (CI = 0,55), следван от таксифолин/фукоидан = 1:1 (CI = 0,66) и таксифолин/фукоидан = 3:1 (CI = 0,80). Синергичният антиоксидантен ефект на смесите таксифолин/фукоидан е важен за оптимизирането на фармацевтичните формулировки за превенция и лечение на различни патологични състояния, причинени от оксидативно увреждане.

Г7.9 Agova M, Georgieva S, Todorova M, **Kiselova Y**, Dimitrova S. Antioxidant activity evaluation of new compounds - hydrazones of bexarotene. Bulgarian Chemical Communications, 2020;52(Special Issue D):191-195.

Abstract

Retinoids are compounds related to vitamin A. The role of vitamin A as an antioxidant has long been known. Vitamin A and its natural and synthetic analogues play an important role in the human body and are implicated in several biological functions. Bexarotene is a third-generation synthetic retinoid used in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. The present paper reports the evaluation of new compounds – hydrazones of bexarotene – about their free radical scavenging activity. The tested substances were synthesized in our previous work and were analyzed by infrared spectroscopy. The antioxidant potential of hydrazones was determined by three different approaches. We used classical 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) tests. DPPH is a stable free radical which has an unpaired valence electron at one atom of the nitrogen bridge. Scavenging of DPPH radical is the basis of the popular DPPH antioxidant assay. Another approach by which we investigated the antioxidant properties of the new compounds was an electrochemical method. The experimental methodology involves the recording of a voltammogram of cathodes electro-oxygen reduction.

Резюме

Ретиноидите са съединения, свързани с витамин А. Ролята на витамин А като антиоксидант е отдавна известна. Витамин А и неговите естествени и синтетични аналози играят важна роля в човешкото тяло и участват в няколко биологични функции. Бексаротен е трето поколение синтетичен ретиноид, използван при лечението на кожен Т-клетъчен лимфом.

Настоящата статия докладва оценката на нови съединения - хидразони на бексаротен – по отношение на тяхната активност за обезвреждане на свободните радикали. Тестваните вещества бяха синтезирани в предишната ни работа и бяха анализирани чрез инфрачервена спектроскопия. Антиоксидантният потенциал на хидразоните се определя от три различни подхода. Използвахме класически тестове за 1,1-дифенил-2-пикрил-хидразил (DPPH) и 2,2'-азинобис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонова киселина (ABTS)). DPPH е стабилен свободен радикал, който има несдвоен валентен електрон при един атом на азотния мост. Обезвреждането на DPPH радикала е в основата на популярния DPPH антиоксидантен анализ. Друг подход, чрез който изследвахме антиоксидантните свойства на новите съединения, беше електрохимичен метод. Експерименталната методология включва запис на волтамограма на електро-кислородна редукция на катоди.

Г7.10 Todorova M, Pasheva M, **Kiselova-Kaneva Y**, Ivanova D, Galunska B. Phenolics content and antioxidant activity of beverages on the Bulgarian market – wines, juices and compotes. Bulgarian Chemical Communications, 2018;50:164-168.

Abstract

In wine, natural juices and compotes the taste is heavily influenced by the presence of phenolics. They also contribute to the antioxidant activity of fruits and processed foods from them and have health-protecting effect. The phenolic content and antioxidant activity are not included in the standard documentation for food labeling and control. The aim of the present work was to analyze and to compare the content of total phenolics and anthocyanins, as well as the antioxidant potential of alcoholic and non-alcoholic fruit drinks on the Bulgarian market. Commercial natural fruit juices, compotes, red, rosé and white wines on the Bulgarian market were used for testing total phenolics, anthocyanins and antioxidant activity. Among the tested alcoholic drinks, the red wines revealed significantly higher polyphenolic (567 ± 33 mg/L) and AC (97.9 ± 40.7 mg/L) content vs rosé (323 ± 84 mg/L, $p < 0.0001$; 9.9 ± 8.2 mg/L, $p < 0.01$) and white (281 ± 42 mg/L, $p < 0.0001$; 0.2 ± 0.1 mg/L, $p < 0.001$) wines. In the group of the red wines, the highest polyphenolic content (625 ± 13 mg/L) was detected in Merlot wine, and the lowest one in Syrah (534 ± 20 mg/L). The wine Malbec was found to be the richest one in anthocyanins (156.6 ± 1.5 mg/L), while in Mavrud the anthocyanins content was the lowest one (45.2 ± 1.0 mg/L). The tested red wines showed high

antioxidant activity, especially strong in Aronia wine (45.55 ± 0.35 mM uric acid equivalent, UAE). In the tested non-alcoholic drinks, the highest polyphenolic content was found in Aronia juice (592 ± 9 mg/L) and compote (556 ± 62 mg/L). The red wines and compotes have been an element of traditional nutrition in Bulgaria and nowadays their input in the healthy diet is reassessed because of their high phenolics content and strong antioxidant potential.

Резюме

Във виното, натуралните сокове и компотите вкусът е силно повлиян от наличието на феноли. Те също допринасят за антиоксидантната активност на плодовете и преработените храни от тях и имат здравеопазващ ефект. Фенолното съдържание и антиоксидантната активност не са включени в стандартната документация за етикетиране и контрол на храните. Целта на настоящата работа е да се анализира и сравни съдържанието на общи феноли и антоцианини, както и антиоксидантния потенциал на алкохолни и безалкохолни плодови напитки на българския пазар. За изследване на общи феноли, антоцианини и антиоксидантна активност са използвани търговски натурални плодови сокове, компоти, червени, розе и бели вина на българския пазар. Сред тестваните алкохолни напитки червените вина показват значително по-високо съдържание на полифеноли (567 ± 33 mg/L) и антоцианини (97.9 ± 40.7 mg/L) спрямо розе (323 ± 84 mg/L, $p < 0.0001$; 9.9 ± 8.2 mg/L, $p < 0.01$) и бели (281 ± 42 mg/L, $p < 0.0001$; 0.2 ± 0.1 mg/L, $p < 0.001$) вина. В групата на червените вина най-високо полифенолно съдържание (625 ± 13 mg/L) е установено във виното Мерло, а най-ниско – при Сира (534 ± 20 mg/L). Установено е, че най-богато на антоцианини е виното Малбек ($156,6 \pm 1,5$ mg/L), докато при Мавруд съдържанието на антоцианини е най-ниско ($45,2 \pm 1,0$ mg/L). Тестваните червени вина показват висока антиоксидантна активност, особено силна във виното от арония ($45,55 \pm 0,35$ mM еквивалент на пикочна киселина, ОАЕ). В тестваните безалкохолни напитки най-високо съдържание на полифеноли е установено в сока от арония (592 ± 9 mg/L) и компота (556 ± 62 mg/L). Червените вина и компотите са били елемент от традиционното хранене в България, а в днешно време техният принос в здравословното хранене се преоценява поради високото им съдържание на феноли и силен антиоксидантен потенциал.

Г7.11 Nazifova-Tasinova N, Atanasov A, Pasheva M, Yotov Y, Gerova D, Vankova D, Todorova M, Ivanova D, **Kiselova-Kaneva Y**, Galunska B. Circulating uncarboxylated matrix Gla protein in patients with atrial fibrillation or heart failure with preserved ejection fraction. Archives of Physiology and Biochemistry. 2020;1-11. DOI: 10.1080/13813455.2020.1786130.

Abstract

Context: Circulating uncarboxylated matrix Gla protein (ucMGP) is possibly related to coronary arterial calcification (CAC) in cardiovascular disease (CVD) patients. **Objective:** We aimed to evaluate the relationships between circulating ucMGP, CVD pathology and CAC and its interplay with CVD risk factors. **Materials and methods:** ucMGP was measured in 99 CVD-patients. CAC score was determined by multislice computed tomography. Circulating ucMGP, uncarboxylated (ucOC) and carboxylated osteocalcin (cOC) were assayed by ELISA kits. Vitamin-K status was evaluated by ucOC/cOC ratio. **Results:** A tendency for decreased ucMGP was observed for CAC 100 AU vs. CAC $\frac{1}{4}$ 1-99 AU after exclusion of the patients on vitamin K-antagonist anticoagulants. Significant inverse correlations between ucMGP and vitamin-K status were indicated for the entire cohort and according to CAC score. Significant associations were found between ucMGP and risk factors for CVD. **Conclusion:** Circulating ucMGP may reflect certain stages of CVD and CAC. Future studies are needed to clarify its role as potential biomarker.

Резюме

Контекст: Циркулиращият некарбоксилиран матриксен Gla протеин (ucMGP) вероятно е свързан с коронарна артериална калцификация (CAC) при пациенти със сърдечно-съдови заболявания (CVD). **Цел:** Имахме за цел да оценим връзките между циркулиращия ucMGP, ССЗ патологията и CAC и нейното взаимодействие с рисковите фактори за ССЗ. **Материали и методи:** ucMGP е измерен при 99 пациенти със ССЗ. CAC резултатът се определя чрез мултисрезова компютърна томография. Циркулиращият ucMGP, некарбоксилиран (ucOC) и карбоксилиран остеокалцин (cOC) бяха анализирани с ELISA китове. Състоянието на витамин К се оценява чрез съотношението ucOC/cOC. **Резултати:** Наблюдава се тенденция за понижен ucMGP за CAC 100 AU спрямо CAC=1-99 AU след изключване на пациентите на антикоагуланти антагонисти на витамин К. Значителни обратни корелации между ucMGP и статуса на витамин К са посочени за цялата кохорта и според CAC резултата. **Намерени са значителни връзки между ucMGP и рисковите фактори за ССЗ. Заключение:**

Циркулиращият ucMGP може да отразява определени етапи на ССЗ и САС. Необходими са бъдещи проучвания, за да се изясни ролята му като потенциален биомаркер.

Г7.12 Kiselova-Kaneva Y, Nazifova-Tasinova N, Vankova D, Nikolova M, Pasheva M, Yotov Y, Atanasov A, Galunska B. Matrix Gla-protein expression in peripheral blood mononuclear cells is related to risk factors in cardiovascular diseased patients. Turkish Journal of Biochemistry. 2021.

Abstract

Methods: MGP expression was measured in 87 individuals using real time qPCR. Subgrouping was performed according etiologic and metabolic CVD risk factors. **Results:** A clear trend for a decreased MGP expression was observed in all subgroups with high CVD risk. This decrease was significant in abdominally obese hypertensive individuals and in those with dyslipidemia. MGP expression was significantly lower in patients representing high Total cholesterol and LDL cholesterol levels. A positive correlation between MGP expression and smoking status in patients with coronary calcium and in the CVD group was established. Atrial hypertension duration correlated negatively with MGP expression in the group without coronary calcium deposits. **Conclusions:** The current study supports the hypothesis that MGP expression in PBMC probably reflects CVD pathology and is related to lipid metabolism dysregulation. **Keywords:** biomarkers; cardiovascular disease; gene expression; matrix Gla-protein; peripheral blood mononuclear cells.

Резюме

Методи: Експресията на MGP беше измерена при 87 души, използвайки real-Time qPCR. Подгруппирането е извършено според етиологичните и метаболитните рискови фактори за ССЗ. **Резултати:** Ясна тенденция за намалена експресия на MGP се наблюдава във всички подгрупи с висок риск от ССЗ. Това намаление е значително при хора с абдоминално затлъстяване и хипертония и при тези с дислипидемия. Експресията на MGP е значително по-ниска при пациенти с високи нива на общ холестерол и LDL холестерол. Установена е положителна корелация между експресията на MGP и статуса на тютюнопушене при пациенти с коронарен калций и в групата със ССЗ. Продължителността на артериалната хипертония корелира отрицателно с експресията на MGP в групата без коронарни калциеви отлагания. **Заключения:** Настоящото проучване подкрепя хипотезата, че експресията на

MGP в РВМС вероятно отразява патологията на ССЗ и е свързана с дисрегулация на липидния метаболизъм.

Г7.13 Nikolova M, Nazifova-Tasinova N, Vankova D, Gerova D, Yotov Y, Atanasov A, Pasheva M, **Kiselova-Kaneva Y**, Galunska B. Vitamin D Status in Patients with Atrial Fibrillation and Heart Failure - Is there a Link? Clinical laboratory. 2021;67(6):1337-1348.

Abstract

Background: The disturbed pleiotropic functions of vitamin D are related to numerous chronic non-skeletal diseases. The role of vitamin D insufficiency/deficiency in cardiovascular diseases (CVD) is controversial. Therefore, the aim was to study the vitamin D status in CVD patients and to reveal possible relationships with CVD risk factors. Methods: This prospective study includes 93 individuals divided into two groups - patients with CVD (n = 49) and patients at risk for CVD (n = 44) served as controls. The CVD-patients were stratified into AF-group - with paroxysmal or persistent atrial fibrillation and HF-group - with heart failure with preserved ejection fraction, in sinus rhythm. Vitamin D status was assessed by measurement of serum 25-hydroxy-vitamin D (25OHD) using liquid chromatography with mass detection. Gene expression of the regulatory enzyme of vitamin D metabolism, 1- α -hydroxylase (CYP27B1), was evaluated by two-step real-time qPCR. Coronary artery calcium scans were performed and coronary artery calcium score (CACS) was calculated. Routine biochemical parameters were extracted from the medical documentation. Standard statistical methods (descriptive statistics, unpaired Student's t-test, one-way ANOVA, simple and multiple linear regression analyses) were applied. Statistical significance was considered at $p < 0.05$. Results: Serum 25OHD levels of the controls were higher than those of the CVD-patients (37.36 ± 15.10 ng/mL vs. 27.70 ± 11.80 ng/mL, $p = 0.008$). The vitamin D status worsened with the severity of CVD pathology: significant decrease of 25OHD levels was found in the AF-group (29.56 ± 11.76 ng/mL, $p = 0.044$) and HF-group (24.47 ± 11.61 ng/mL, $p = 0.003$) vs. controls (37.36 ± 15.10 ng/mL). Significant reduction in circulating vitamin D levels with the increase of CACS ($p = 0.007$) was also observed. Linear regression analysis revealed significant negative association for serum 25OHD with CACS for both the entire studied group ($p = 0.008$) and for CVD patients ($p = 0.049$). The gene expression of CYP27B1 was down regulated with both the severity of CVD pathology ($p = 0.05$) and coronary calcium accumulation ($p = 0.08$).

Moreover, we found a significant positive relationship ($p = 0.041$) between serum 25OHD levels and CYP27B1 gene expression. Conclusions: Vitamin D deficiency may be an independent cardiovascular risk factor associated with the severity of CVD pathology and increased coronary calcium deposition. The mechanism by which vitamin D itself can affect cardiovascular outcomes remains to be clarified.

Резюме

Въведение: Нарушените плейотропни функции на витамин D са свързани с множество хронични несkeletalни заболявания. Ролята на недостатъчността/дефицита на витамин D при сърдечно-съдови заболявания (ССЗ) е противоречива. Следователно, целта беше да се проучи статусът на витамин D при пациенти със ССЗ и да се разкрият възможни връзки с рисковите фактори за ССЗ. **Методи:** Това проспективно проучване включва 93 лица, разделени в две групи - пациенти със ССЗ ($n = 49$) и пациенти с риск от ССЗ ($n = 44$), служещи за контрола. ССЗ-болните са стратифицирани в AF-група - с пароксизмално или персистиращо предсърдно мъждене и HF-група - със сърдечна недостатъчност със запазена фракция на изтласкване, в синусов ритъм. Състоянието на витамин D се оценява чрез измерване на серумен 25-хидрокси-витамин D (25OHD) с помощта на течна хроматография с мас детекция. Генната експресия на регулаторния ензим на метаболизма на витамин D, 1-алфа-хидроксилаза (CYP27B1), беше оценена чрез двустъпков qPCR в реално време. Проведени са калциеви сканирания на коронарни артерии и е изчислен калциевият скор на коронарни артерии (CACS). Рутинните биохимични параметри са извлечени от медицинската документация. Бяха приложени стандартни статистически методи (дескриптивна статистика, нечифтен t-тест на Student, еднопосочен ANOVA, обикновен и множествен линеен регресионен анализ). Статистическата значимост се разглежда при $p < 0.05$. **Резултати:** Серумните нива на 25OHD на контролите са по-високи от тези на пациентите със ССЗ ($37,36 \pm 15,10$ ng/mL спрямо $27,70 \pm 11,80$ ng/mL, $p = 0,008$). Състоянието на витамин D се влошава с тежестта на ССЗ патологията: установено е значително понижени нива на 25OHD в групата с AF ($29,56 \pm 11,76$ ng/mL, $p = 0,044$) и HF-групата ($24,47 \pm 11,61$ ng/mL, $p = 0,003$) спрямо контролите ($37,36 \pm 15,10$ ng/mL). Наблюдава се също значително намаляване на нивата на циркулиращия витамин D с повишаване на CACS ($p = 0,007$). Анализът на линейната регресия разкри значителна

отрицателна връзка за серумния 25OHD с CACS както за цялата изследвана група ($p = 0,008$), така и за пациенти със ССЗ ($p = 0,049$). Генната експресия на CYP27B1 намалява както с тежестта на ССЗ патологията ($p = 0,05$), така и с коронарното натрупване на калций ($p = 0,08$). Освен това открихме значителна положителна връзка ($p = 0,041$) между серумните нива на 25OHD и генната експресия на CYP27B1. Заключение: Дефицитът на витамин D може да бъде независим сърдечно-съдов рисков фактор, свързан с тежестта на ССЗ патологията и повишеното коронарно отлагане на калций. Механизмът, чрез който самият витамин D може да повлияе на сърдечно-съдовите резултати, остава да бъде изяснен.

Г7.14 Fiamoncini J, Donado-Pestana CM, Duarte GBS, Rundle M, Thomas EL, **Kiselova-Kaneva Y**, Gundersen TE, Bunzel D, Trezzi JP, Kulling SE, Hiller K, Sonntag D, Ivanova D, Brennan L, Wopereis S, van Ommen B, Frost G, Bell J, Drevon CA, Daniel H. Plasma Metabolic Signatures of Healthy Overweight Subjects Challenged With an Oral Glucose Tolerance Test. *Front Nutr.* 2022;9:898782.

Abstract

Insulin secretion following ingestion of a carbohydrate load affects a multitude of metabolic pathways that simultaneously change direction and quantity of interorgan fluxes of sugars, lipids and amino acids. In the present study, we aimed at identifying markers associated with differential responses to an OGTT a population of healthy adults. By use of three metabolite profiling platforms, we assessed these postprandial responses of a total of 202 metabolites in plasma of 72 healthy volunteers undergoing comprehensive phenotyping and of which half enrolled into a weight-loss program over a three-month period. A standard oral glucose tolerance test (OGTT) served as dietary challenge test to identify changes in postprandial metabolite profiles. Despite classified as healthy according to WHO criteria, two discrete clusters (A and B) were identified based on the postprandial glucose profiles with a balanced distribution of volunteers based on gender and other measures. Cluster A individuals displayed 26% higher postprandial glucose levels, delayed glucose clearance and increased fasting plasma concentrations of more than 20 known biomarkers of insulin resistance and diabetes previously identified in large cohort studies. The volunteers identified by canonical postprandial responses that form cluster A may be called pre-pre-diabetics and defined as “at risk” for development of insulin resistance. Moreover,

postprandial changes in selected fatty acids and complex lipids, bile acids, amino acids, acylcarnitines and sugars like mannose revealed marked differences in the responses seen in cluster A and cluster B individuals that sustained over the entire challenge test period of 240 min. Almost all metabolites, including glucose and insulin, returned to baseline values at the end of the test (at 240 min), except a variety of amino acids and here those that have been linked to diabetes development. Analysis of the corresponding metabolite profile in a fasting blood sample may therefore allow for early identification of these subjects at risk for insulin resistance without the need to undergo an OGTT.

Резюме

Секрецията на инсулин след въглехидратно натоварване засяга множество метаболитни пътища, които едновременно променят посоката и количеството на междуорганните потоци на захари, липиди и аминокиселини. В настоящото проучване ние имаме за цел да идентифицираме маркери, свързани с диференциални отговори към OGTT в популация от здрави възрастни. Чрез използване на три платформи за профилиране на метаболити, ние оценихме тези постпрандиални отговори на общо 202 метаболита в плазмата на 72 здрави доброволци, подложени на цялостно фенотипизиране и половината от които са включени в програма за отслабване за период от три месеца. Стандартен орален глюкозо-толерантен тест (OGTT) служи като тест за идентифициране на промените в постпрандиалните метаболитни профили. Въпреки че са класифицирани като здрави според критериите на СЗО, два отделни клъстера (А и В) бяха идентифицирани въз основа на постпрандиалните глюкозни профили с балансирано разпределение на доброволците въз основа на пола и други показатели. Индивидите от клъстер А показват 26% по-високи постпрандиални нива на глюкоза, забавен глюкозен клирънс и повишени плазмени концентрации на гладно на повече от 20 известни биомаркера за инсулинова резистентност и диабет, идентифицирани преди това в големи кохортни проучвания. Доброволците, идентифицирани чрез канонични постпрандиални отговори, които образуват клъстер А, могат да бъдат наречени пред-предиабетици и определени като „изложени на риск“ за развитие на инсулинова резистентност. Освен това, постпрандиалните промени в избрани мастни киселини и комплексни липиди, жлъчни киселини, аминокиселини, ацилкарнитини и захари като маноза разкриват значителни разлики в отговорите, наблюдавани при индивиди от клъстер

А и клъстер Б, които се поддържат през целия период на теста от 240 минути. Почти всички метаболити, включително глюкоза и инсулин, се върнаха към базовите стойности в края на теста (на 240-та минута), с изключение на различни аминокиселини и тук тези, които са свързани с развитието на диабет. Следователно анализът на съответния метаболитен профил в кръвна проба на гладно може да позволи ранно идентифициране на тези субекти с риск от инсулинова резистентност, без да е необходимо да се подлагат на OGTT.

Г7.15 Angelova S, Salim A, **Kiselova-Kaneva Y**, Ivanova D, Peev S. Association of mRNA Levels of IL6, MMP-8, GSS in saliva and pyelonephritis in children. *Molecules*. 2020; 25(1):85.

Abstract

Nowadays, saliva is a subject of growing scientific interest because of its definite advantages as diagnostic medium. The aim of our study was to investigate the diagnostic potential and reliability of messenger RNAs (mRNAs) of selected genes—interleukin-6 (IL-6), matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) and glutathione synthetase (GSS)—as salivary markers in children with diagnosed pyelonephritis and to correlate their levels with typical urine para-clinical indicators of the disease. Analysis of the mRNA levels for IL-6, MMP-8 and GSS in 28 children hospitalized with the diagnosis of pyelonephritis was conducted applying the method of quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR). In the study group ($n = 28$), IL-6 mRNA levels demonstrated 64-fold increase ($p < 0.001$). MMP-8 and GSS mRNA levels were increased in 12 samples in patients with pyelonephritis 3.27 ($p < 0.01$) and 1.94 ($p < 0.001$) times, respectively. We found a strong and significant correlation ($p < 0.001$) between the investigated mRNA for IL-6 and MMP-8, IL-6 and GSS, MMP-8 and GSS. Moderate degree of correlation was established between IL-6 and the typical para-clinical indicator of leucocytes (0.43, $p < 0.05$) and between GSS and leucocytes (0.54, $p < 0.01$). Salivary IL-6, MMP-8 and GSS mRNA levels in combination with urine test analysis could be useful diagnostic tool for the very distributed disorder of pyelonephritis in childhood.

Резюме

В наши дни слюнката е обект на нарастващ научен интерес поради категоричните си предимства като диагностична среда. Целта на нашето проучване беше да изследваме

диагностичния потенциал и надеждността на информационните РНК (иРНК) на избрани гени - интерлевкин-6 (IL-6), матриксна металопротеиназа-8 (MMP-8) и глутатион синтетаза (GSS) - като маркери в слюнка при деца с диагностициран пиелонефрит и да се съпоставят нивата им с типичните параклинични показатели на заболяването в урината. Анализът на нивата на иРНК за IL-6, MMP-8 и GSS при 28 деца, хоспитализирани с диагноза пиелонефрит, е извършен по метода на количествена полимеразна верижна реакция с обратна транскрипция (RT-qPCR). В проучваната група (n = 28) нивата на IL-6 mRNA показват 64-кратно увеличение (p < 0,001). Нивата на MMP-8 и GSS mRNA са повишени в 12 проби при пациенти с пиелонефрит съответно 3,27 (p < 0,01) и 1,94 (p < 0,001) пъти. Ние открихме силна и значима корелация (p < 0.001) между изследваната иРНК за IL-6 и MMP-8, IL-6 и GSS, MMP-8 и GSS. Установена е умерена степен на корелация между IL-6 и типичния параклиничен показател левкоцити (0.43, p < 0.05) и между GSS и левкоцити (0.54, p < 0.01). Слюнчените нива на IL-6, MMP-8 и GSS иРНК в комбинация с анализ на урината могат да бъдат полезен диагностичен инструмент за много разпространеното заболяване на пиелонефрит в детска възраст.

Г7.16 Angelova S, Salim A, Roussev B, **Kiselova-Kaneva Y**, Ivanova D, Peev S. Association of the Salivary sIgA and Dextran with Clinical Parameters of Plaque-induced Gingivitis in Children. Supplement Journal of IMAB. 2021;33-36.

Abstract

Purpose: Study of the association between salivary secretory immunoglobulin A (sIg A) and dextran levels with clinical parameters of plaque-induced gingivitis in children. **Materials and methods:** Four groups of participants based on gingival status. Plaque index and gingival index were determined. ELISA-methods were used for quantification of the salivary markers. **Results:** The average value of salivary dextran among these with severe gingivitis was 2.93-fold higher in comparison to the control group. A significant positive correlation between Plaque index Silness-Löe (PLI) and salivary dextran was established among the participants with moderate and severe gingivitis. The average value of salivary sIg A in the participants with severe gingivitis was 2.25-fold higher compared to the same parameter among the controls. A high positive correlation between GI and salivary dextran was recorded in the group with mild gingivitis. **Conclusion:**

Salivary sIg A and dextran levels are associated with clinically manifested degrees of plaque-induced gingivitis in children.

Резюме

Цел: Проучване на връзката между слюнчените секреторни имуноглобулини А (sIg А) и нивата на декстран с клиничните параметри на плака-индуциран гингивит при деца.

Материали и методи: Четири групи участници на базата на гингивалния статус. Определят се индекс на плака и гингивален индекс. Използвани са ELISA-методи за количествено определяне на слюнчените маркери. **Резултати:** Средната стойност на декстран в слюнката сред тези с тежък гингивит е 2,93 пъти по-висока в сравнение с контролната група. Установена е значителна положителна корелация между плаковия индекс и слюнчения декстран сред участниците с умерен и тежък гингивит. Средната стойност на sIg А на слюнката при участниците с тежък гингивит е 2,25 пъти по-висока в сравнение със същия параметър сред контролите. Висока положителна корелация между GI и слюнчен декстран е регистрирана в групата с лек гингивит. **Заключение:** Нивата на sIg А и декстран в слюнката са свързани с клинично изявени степени на индуциран от плака гингивит при деца.

Г7.17 Jura-Póltorak A, Olczyk P, Chałas-Lipka A, Komosińska-Vassev K, Kuźnik-Trocha K, Winsz-Szczotka K, Ivanova D, **Kiselova-Kaneva Y**, Krysik K, Telega A, Olczyk K. Urinary sulphated glycosaminoglycans excretion in obese patients with type 2 diabetes mellitus treated with metformin. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2022;128(2):507-513.

Abstract

Objective: The pattern of urinary excretion of total sulphated glycosaminoglycans (GAGs) and their particular types: chondroitin sulphate/dermatan sulphate (CS/DS) and heparan sulphate (HS) was analysed in obese patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) treated with metformin in monotherapy for the period of six months. **Methods:** The urinary sulphated glycosaminoglycans were quantitated using standardised dye (1.9-dimethylmethylene blue)-binding method and normalised to creatinine level. **Results:** Urinary total GAGs, CS/DS and HS levels were significantly higher in untreated diabetic patients in comparison to healthy subjects. Moreover, it was observed that urinary total GAGs, CS/DS and HS levels in diabetic patients after six-month

metformin therapy were significantly decreased versus pre-treatment situation. Conclusions: The obtained results suggest that the six-month treatment with metformin in obese patients with T2DM has a regulating influence on the systemic changes in proteoglycans/glycosaminoglycans, resulting in a decrease in the urinary excretion of total GAGs, CS/DS and HS.

Резюме

Цел: Анализирани са спектъра на уринарна екскреция на общи сулфатирани гликозаминогликани (GAG) и техните специфични типове: хондроитин сулфат/дерматан сулфат (CS/DS) и хепаран сулфат (HS) при пациенти със затлъстяване със захарен диабет тип 2 (T2DM), лекувани с метформин като монотерапия за период от шест месеца. Методи: Сулфатираните гликозаминогликани в урината се определят количествено, като се използва стандартизиран метод за свързване на багрилото (1,9-диметилметиленово синьо) и се нормализират до ниво на креатинин. Резултати: Общите нива на GAG, CS/DS и HS в урината са значително по-високи при нелекувани пациенти с диабет в сравнение със здрави индивиди. Освен това се наблюдава, че общите нива на GAG, CS/DS и HS в урината при пациенти с диабет след шестмесечна терапия с метформин са значително намалени в сравнение със ситуацията преди лечението. Изводи: Получените резултати предполагат, че шестмесечното лечение с метформин при пациенти със затлъстяване и T2DM има регулиращ ефект върху системните промени в протеогликаните/гликозаминогликаните, което води до намаляване на уринарната екскреция на общи GAG, CS/DS и HS.

Г7.18 Dimaras P, Tasinov O, Ivanova DP, **Kiselova-Kaneva Y**, Stefanova N, Tzaneva M, Ivanova D. Improving gene expression analysis efficacy from formalin-fixed paraffin embedded tissues. *Folia medica*. 2022;64(4): 602-608.

Abstract

Introduction: Improving RNA isolation and cDNA synthesis techniques has emerged due to advancements in the knowledge of molecular basis of most diseases. This in turn increased the need of higher quantity and quality of the extracted genetic material to be used for a variety of diagnostic tests and experiments. Aim: The aim of the study was to compare three modified methods for RNA extraction from formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) biopsied tissue and

different cDNA synthesis strategies to facilitate study of gene expression. Materials and methods: Compared RNA extraction methods were: lysis buffer, phenol-based extraction, and combination of both with concomitant use of silica-based spin columns. RNA quantity and purity were estimated spectrophotometrically. Different priming strategies for cDNA synthesis were applied: oligo dT, combination of oligo dT and random hexamer, and gene specific primer. Two-step RT-qPCR of ribosomal protein L37A on preamplified and non-preamplified cDNA templates was performed. Results: The combination of lysis buffer with phenol based extraction gave higher RNA yield. By doing cDNA preamplification, the confidence of detection by qPCR was raised, and efficiency was improved. The preamplified template increased the sensitivity of analysis. Conclusions: Together, the combination of approaches improved substantially the reproducibility and validity of quantitative gene expression analyses from FFPE tissues.

Резюме

Въведение: Поради напредъка в познанията за молекулярната основа на повечето заболявания се появи необходимост от подобряването на техниките за изолиране на РНК и синтез на cДНК. Това от своя страна увеличи необходимостта от по-високо количество и качество на извлечения генетичен материал, който да се използва за различни диагностични тестове и експерименти. **Цел:** Целта на изследването беше да се сравнят три модифицирани метода за екстракция на РНК от биопсирана тъкан, фиксирана във формалин, вградена в парафин (FFPE) и различни стратегии за синтез на cДНК, за да се улесни изследването на генната експресия. **Материали и методи:** Сравнените методи за екстракция на РНК бяха: лизисен буфер, екстракция на основата на фенол и комбинация от двете с едновременна употреба на колони на основата на силициев диоксид. Количеството и чистотата на РНК се оценяват спектрофотометрично. Бяха приложени различни стратегии за синтез на cДНК: олиго dT, комбинация от олиго dT и произволен хексамер и генно специфичен праймер. **Беше извършен** двустъпков qPCR на рибозомален протеин L37A върху предварително амплифицирани и неамплифицирани cDNA матрици. **Резултати:** Комбинацията от лизисен буфер с екстракция на основата на фенол дава по-висок добив на РНК. Чрез извършване на предварително усилване на cDNA, степента на откриване чрез qPCR беше повишена и ефективността беше подобрена. Предварително амплифицираният шаблон увеличи чувствителността на анализа. **Заключения:** Комбинацията от подходи подобри значително

възпроизводимостта и валидността на количествените анализи на генната експресия от FFPE тъкани.

Г8. Публикувана глава от книга или колективна монография

Г8.1 Vankova D, Pasheva M, **Kiselova-Kaneva Y**, Ivanov D, Ivanova D. Mechanisms of Cyanotoxin Toxicity—Carcinogenicity, Anticancer Potential, and Clinical Toxicology. In: Medical Toxicology, 2019; DOI: 10.5772/intechopen.88016.

Abstract

Cyanoprokaryotes are distributed worldwide and they produce various bioactive compounds, including cyanotoxins. The major route of human exposure to cyanotoxins is the oral intake by using contaminated drinking water, by incidental intake of contaminated water during recreational and professional activities, and by consuming contaminated food or dietary supplements prepared from cyanobacteria. The prolonged chronic exposure to low concentrations of cyanotoxins provokes cell damage and may increase the risk for cancer development. Due to the variety of cyanotoxin chemical structures, different mechanisms of their toxic effects are known. At the same time, some of the natural compounds produced by cyanoprokaryotes have anticancer potential and are promising sources for the development of novel drugs. This chapter is dedicated to the target mechanisms behind the effects of the widely distributed cyanotoxins with an impact on human health, microcystins, nodularins, and cylindrospermopsin.

Резюме

Цианопрокариотите са разпространени по целия свят и произвеждат различни биоактивни съединения, включително цианотоксини. Основният път на излагане на хора на цианотоксини е пероралният прием чрез използване на замърсена питейна вода, чрез случаен прием на замърсена вода по време на развлекателни и професионални дейности и чрез консумация на замърсена храна или диетични добавки, приготвени от цианобактерии. Продължителното хронично излагане на ниски концентрации на цианотоксини провокира увреждане на клетките и може да увеличи риска от развитие на рак. Поради разнообразието от химични структури на цианотоксините са известни различни механизми на тяхното токсично действие. В същото време някои от естествените съединения, произведени от

цианопрокариоти, имат противораков потенциал и са обещаващи източници за разработването на нови лекарства. Тази глава е посветена на целевите механизми зад ефектите на широко разпространените цианотоксини с въздействие върху човешкото здраве - микроцистини, нодуларини и цилиндроспермопсин.

Г8.2. Nashar M, **Kiselova-Kaneva Y**, Ivanova D. Antidiabetic Potential of Plants Used in Bulgarian Folk Medicine and Traditional Diet. In: Nutrition in Health and Disease, 2019; DOI: 10.5772/intechopen.85445.

Abstract

The idea of this chapter is that currently available antidiabetic drugs specifically target several points of the T2D pathophysiology but they do not cover all aspects of the disease. In addition, many adverse effects of synthetic antidiabetic agents have been reported. The suggested manuscript is an overview of the available scientific literature focused on antiobesity and antidiabetic potential of selected 42 medicinal and edible plants of the Bulgarian flora. Most of the reports reveal the effect of extracts or their active components on specific biochemical mechanisms. Mechanistic data about hypoglycemic and hypolipidemic action are presented for some of the plants. An essential part of this review is dedicated to the target mechanisms behind the effects of the selected plant species. The authors hope that this review will serve as a starting point for future investigations with a contribution to the prevention and therapy of diabetes.

Резюме

Идеята на тази глава е, че наличните в момента антидиабетни лекарства са насочени конкретно към няколко точки от патофизиологията на диабет тип 2, но те не покриват всички аспекти на заболяването. Освен това са докладвани много неблагоприятни ефекти на синтетичните антидиабетни средства. Настоящият материал представлява преглед на наличната научна литература, фокусирана върху анти-обеситния и антидиабетния потенциал на избрани 42 лечебни и растения от българската флора. Повечето от докладите разкриват ефекта на екстрактите или техните активни компоненти върху специфични биохимични механизми. Представени са данни за механизмите на хипогликемично и хиполипидемично действие за някои от растенията. Съществена част от този преглед е

посветена на целевите механизми зад ефектите на избраните растителни видове. Авторите се надяват, че този преглед ще послужи като отправна точка за бъдещи изследвания с принос към превенцията и терапията на диабета.

Пълнотекстови публикации в научни списания и сборници, извън минималните наукометрични изисквания за заемане на АД „Професор“

1. Angelova S, Salim A, **Kislova-Kaneva Y**, Ivanova D, Andreeva-Borisova R, Peev S. The role and significance of some salivary amino acids in periodontal diseases, including plaque-induced gingivitis—a literature review. *Scripta Scientifica Dentalis*, 2022;2(7):7-17

Abstract

Nowadays the problem of plaque-induced gingivitis, including in the different periods of childhood, is marked by a considerable long-term sociomedical impact on individual, group, population and community levels globally. The purpose of this investigation is to study, analyze and summarize various scientific sources on the role and significance of some salivary amino acids in the presence of periodontal diseases, including plaque-induced gingivitis. This manuscript is based on data obtained from research articles, randomized trials, and systemic reviews published in PubMed and Google Scholar. Different salivary markers are characterized by potential for earlier diagnosis of the progression of oral diseases. We can conclude that some salivary amino acids play a considerable role in the periodontal status, including in plaque-induced gingivitis.

Резюме

В наши дни проблемът с предизвикания от плака гингивит, включително в различните периоди на детството, е белязан от значително дългосрочно социално-медицинско въздействие върху индивидуално, групово, популационно и общностно ниво в световен мащаб. Целта на това изследване е да проучи, анализира и обобщи различни научни източници за ролята и значението на някои слюнчени аминокиселини при наличие на пародонтални заболявания, включително предизвикан от плака гингивит. Това изследване се основава на данни, получени от научни статии, рандомизирани проучвания и системни прегледи, публикувани в PubMed и Google Scholar. Различните слюнчени маркери се

характеризират с потенциал за ранна диагностика на прогресията на оралните заболявания. Можем да заключим, че някои слюнчени аминокиселини играят значителна роля в пародонталния статус, включително при предизвикан от плака гингивит.

2. Kiselova Y, Vankova D, Tasinov O, Feklicheva I, Potoroko I, Ivanova D. Changes in interleukin 6 and monocyte chemoattractant protein-1 expression levels in 3t3-l1 cells after exposure to agrimonia eupatoria l. extract and subsequent oxidative stimulation with tert-butyl hydroperoxide reveal possible adaptogenic potential. Scri Sci Pharm, 2017;4(2):7-13

Abstract

INTRODUCTION: Synthesis and secretion of many inflammatory factors increase with oxidative stimulation and the activity of many transcription factors that regulate synthesis of inflammatory cytokines is influenced by the redox condition in the cell. **AIM:** The aim of the current study was to investigate the effects of aqueous-alcoholic agrimony extract on interleukin 6 (IL-6) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene expression levels in cultured preadipocytes under induced oxidative stress conditions. **MATERIALS AND METHODS:** To determine the possible adaptogenic potential of agrimony extract treatment on gene expression, preadipocytes were incubated in a medium containing different amounts of agrimony extract. Tert-butyl hydroperoxide was used to provoke oxidative response in treated cells. Expression of selected genes was measured using two step quantitative PCR. Results were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **RESULTS:** Incubation of preadipocytes with 2.5% agrimony extract resulted in a significant decrease in mRNA levels of MCP-1. Significant increase in IL-6 transcription levels was detected in the cells incubated with 1.25% and 2.5% agrimony extract. Pre-incubation of the cells with agrimony extract prevented subsequent oxidative induced stimulation of MCP-1 gene expression. Oxidative provocation appeared to decrease the stimulatory activity of agrimony on IL-6 gene expression.

Резюме

ВЪВЕДЕНИЕ: Синтезът и секрецията на много възпалителни фактори се увеличават при окислителна стимулация и активността на много транскрипционни фактори, които регулират синтеза на възпалителни цитокини, се влияе от редокс състоянието в клетката.

ЦЕЛ: Целта на настоящото проучване е да се изследват ефектите на водно-алкохолнен екстракт от камшик (*Agrimonia*) върху нивата на експресия на ген за интерлевкин 6 (IL-6) и моноцитен хемоатрактантен протеин-1 (MCP-1) в култивирани преадипоцити при условия на индуциран оксидативен стрес. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ: За да се определи възможният адаптогенен потенциал на третирането с екстракт от камшик върху генната експресия, преадипоцитите се инкубират в среда, съдържаща различни количества екстракт от камшик. Третичен бутилов хидропероксид се използва за провокиране на оксидативен отговор в третираните клетки. Експресията на избрани гени се измерва с помощта на двустъпков количествен PCR. Резултатите бяха анализирани с помощта на метода 2- $\Delta\Delta C_t$. RESULTS: Инкубирането на преадипоцити с 2,5% екстракт от камшик води до значително намаляване на нивата на иРНК на MCP-1. Значително повишаване на нивата на транскрипция на IL-6 беше открито в клетките, инкубирани с 1,25% и 2,5% екстракт от камшик. Предварителната инкубация на клетките с екстракт от камшик предотвратява последваща окислително индуцирана стимулация на експресията на MCP-1 ген. Изглежда, че окислителната провокация намалява стимулиращата активност на агримония върху експресията на гена за IL-6

3. Nazifova-Tasinova ., Tasinov O, Pasheva M, Ivanova D, **Kiselova-Kaneva Y.** Peripheral blood mononuclear cells isolated from normal weight and overweight subjects differentially respond to lipopolysaccharides stimulation. *Science & Technologies*, 2015;5(1):282-89.

Abstract

Bacterial lipopolysaccharides (LPS) has been widely used both in in vitro and in vivo models studying inflammation and the mechanisms of anti-inflammatory action of variety of substances. Profiling of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) could serve as less invasive alternative to tissue biopsies for research purposes in human intervention studies. A model utilizing PBMCs would provide a more direct approach to study inflammation and related cell responses. The aim of the present work was to establish a working model of ex vivo stimulation with LPS of PBMCs isolated from human whole blood. Volunteers were divided into two groups: normal weight subjects with BMI<25 (NW) and overweight subjects with BMI \geq 25 (OW). Expression of two pro-inflammatory genes was measured in order to verify inflammatory response upon LPS

stimulation. LPS treatment effectively induced inflammatory response in PBMCs by increased mRNA levels of IL-1 β and IL-6 genes both in NW ($p < 0.001$) and OW group ($p < 0.05$). IL-1 β mRNA levels exceeded that of IL-6 both in control and LPS treated PBMCs of NW and OW subjects ($p < 0.001$). Our measurements did not establish significant difference between NW and OW group in regard to the initial levels of IL-1 β and IL-6. Moreover, OW PBMCs responded less prominently after LPS stimulation - mRNA levels of IL-6 in OW group were by 73% ($p < 0.001$) and these of IL-1 β – by 55% ($p < 0.05$) lower in the OW group. The presence of various unknown factors in plasma could possibly predetermine the subsequent difference in the response of PBMCs obtained from NW and OW individuals. In conclusion, our model effectively induced inflammatory response in freshly isolated and cultured PBMCs from NW and OW individuals. Gene induction in NW group was more prominent. Although IL-1 β mRNA levels were always higher than IL-6, the last responded more prominently to the treatment.

Резюме

Бактериалните липополизахариди (LPS) се използват широко както в *in vitro*, така и в *in vivo* модели, изучаващи възпалението и механизмите на противовъзпалително действие на различни вещества. Профилирането на мононуклеарни клетки от периферна кръв (PBMCs) може да послужи като по-малко инвазивна алтернатива на тъканните биопсии за изследователски цели в проучвания за човешка намеса. Модел, използващ PBMCs, би осигурил по-директен подход за изследване на възпалението и свързаните с него клетъчни отговори. Целта на настоящата работа беше да се създаде работещ модел на *ex vivo* стимулация с LPS на PBMCs, изолирани от цяла човешка кръв. Доброволците бяха разделени на две групи: такива с нормално тегло с BMI < 25 (NW) и такива с наднормено тегло с BMI \geq 25 (OW). Експресията на два провъзпалителни гена беше измерена, за да се провери възпалителният отговор при LPS стимулация. Лечението с LPS ефективно индуцира възпалителен отговор в PBMCs чрез повишени нива на mRNA на IL-1 β и IL-6 гени както в NW ($p < 0.001$), така и в OW група ($p < 0.05$). Нивата на IL-1 β mRNA надвишават тези на IL-6 както в контролните, така и в третирани с LPS PBMC на NW и OW субекти ($p < 0,001$). Нашите измервания не установиха значителна разлика между NW и OW групата по отношение на първоначалните нива на IL-1 β и IL-6. Освен това, OW PBMC реагират по-слабо след LPS стимулация - нивата на mRNA на IL-6 в OW групата са със 73% ($p < 0.001$), а

тези на IL-1 β – с 55% ($p < 0.05$) по-ниски в OW групата. Наличието на различни неизвестни фактори в плазмата може евентуално да предопредели последващата разлика в отговора на PBMCs, получени от NW и OW индивиди. В заключение, нашият модел ефективно индуцира възпалителен отговор в прясно изолирани и култивирани PBMC от NW и OW индивиди. Генната индукция в NW групата е по-забележима. Въпреки че нивата на IL-1 β mRNA са по-високи от IL-6, последният реагира по-изявнот на третирането.

4. Vankova DG, Nazifova-Tasinova NF, **Kiselova-Kaneva YD**, Ivanova DG. Stress-tolerance tests and postprandial low-grade inflammation response. *Scr Sci Pharm*,2016; 3(1):34-38

Abstract

Both tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and interleukin 6 (IL-6) are considered as proinflammatory cytokines which display marked daily and postprandial variations. The low-grade inflammation is known to contribute to the development of certain states such as type 2 diabetes, metabolic syndrome and related disorders. Oral glucose tolerance test (OGTT) is applied to diagnose diabetes and is widely used to estimate the insulin sensitivity in the postprandial phase. Application of tolerance tests with high lipid content such as oral lipid tolerance test (OLTT), high-fat meal (HFM) and mixed-meal tests are informative for the metabolic response to complex diets. Postprandial hyperlipidemia and hyperglycemia are important and residual risk factors especially in patients with diabetes mellitus and related metabolic disturbances. There are data suggesting that low-grade inflammation could be mediated by hyperglycemia and dyslipidemia. The aim of the review is to summarize how different challenge tests influence the postprandial circulation levels of IL-6 and TNF alpha.

Резюме

Тумор некротизиращият фактор алфа (TNF алфа), така и интерлевкин 6 (IL-6) се считат за провъзпалителни цитокини, които показват изразени дневни и постпрандиални вариации. Известно е, че нискостепенното възпаление допринася за развитието на определени състояния като диабет тип 2, метаболитен синдром и свързани с тях разстройства. Тестът за

орален глюкозен толеранс (OGTT) се прилага за диагностициране на диабет и се използва широко за оценка на инсулиновата чувствителност в постпрандиалната фаза. Прилагането на тестове за толерантност с високо съдържание на липиди, като орален тест за липидна толерантност (OLTТ), храна с високо съдържание на мазнини (НFM) и тестове за смесено хранене, са информативни за метаболитния отговор на сложни диети. Постпрандиалната хиперлипидемия и хипергликемия са важни и остатъчни рискови фактори, особено при пациенти със захарен диабет и свързани метаболитни нарушения. Има данни, които предполагат, че нискостепенното възпаление може да бъде медирано от хипергликемия и дислипидемия. Целта на прегледа е да обобщи как различните провокационни тестове влияят върху постпрандиалните циркуляционни нива на IL-6 и TNF алфа.