



## РЕЗЮМЕТА НА НАУЧНИТЕ ТРУДОВЕ НА БЪЛГАРСКИ И НА АНГЛИЙСКИ ЕЗИК

на  
гл. ас. Оскан Бахидинов Тасинов, дб

представени за участие в конкурс за заемане на АД „доцент“ по специалност „биохимия“, професионално направление 4. Природни науки, математика и информатика, в област на висшето образование 4.3. Биологически науки към Факултет Фармация, Катедра „Биохимия, молекулна медицина и нутригеномика“, съгласно обява в Държавен вестник, бр. 59 от 26.07.2022 г.

Представените резюмета на научни трудове са общо 17, групирани в две части в съответствие с официалната Академичната справка, както следва:

### **I. Научни трудове, покриващи минималните наукометрични изисквания за заемане на АД „доцент“ – 15 бр.**

Показател А1. Дисертационен труд за придобиване на ОНС „доктор“ – 1 бр.

Показател В3. Хабилитационен труд – монография – 1бр.

Показател Г7. Научни публикации, публикувани в издания, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (Web of Science и Scopus) – 13 бр.

### **II. Пълнотекстови публикации в научни списания и сборници, извън минималните наукометрични изисквания за заемане на АД „доцент“ – 2 бр.**

## **I. Научни трудове, покриващи минималните наукометрични изисквания за заемане на АД „доцент“**

**Показател А1.** Дисертационен труд за придобиване на ОНС „доктор“

**Оскан Бахидинов Тасинов.** Проучване на антиоксидантното, антиобезитно и противодиабетно действие на екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* *in vitro* и *in vivo*. 2015, МУ-Варна

**Анотация:** Целта на научният труд е да се анализира протективното, антиоксидантно, антиобезитно и противодиабетно действие на екстракти от плодове на *Sambucus ebulus* L. в различни експериментални модели *in vitro* и *in vivo*. Направен е фитохимичен анализ на различни екстракти от плодове на *S. ebulus* и са определяни концентрациите на тотални полифеноли, антоцианини, антиоксидантна (АО) активност на екстракти от плодове в зависимост от вида и концентрацията на екстрагента. Изследвана е цитотоксичността/цитопротективният ефект на използваните в експериментите с клетъчни култури екстракти от *S. ebulus*. Изследвано е протективното действие на екстракти от плодове на *S. ebulus* върху 3T3-L1 преадипоцити в условия на *t*-ButOOH индуциран оксидативен стрес, чрез анализ на генната експресия на белтъци от вътреклетъчната АО защита и такива свързани с процеса на възпаление. Изследване е и протективното действие на: етилацетатна фракция на тотален метанолен екстракт от плодове на *S. ebulus* върху 3T3-L1 клетки в условия на етанол-индуцирано възпаление, чрез анализ на генната експресия на белтъци от вътреклетъчната АО защита и такива, свързани с възпалението; воден екстракт от плодове на *S. ebulus* върху J744A.1 макрофаги в условия на LPS-индуцирано възпаление, чрез анализ на транскрипцията на белтъци от вътреклетъчната АО защита и такива, свързани с възпалението, както и транслацията на провъзпалителни белтъци и такива, свързани с ER стрес. В интервенция с участието на здрави доброволци е изследвано влиянието на чай от плодове на *S. ebulus*, чрез анализ на АО активност на серум, нивата на кръвна захар, липиди в серум, белтъчните нива на провъзпалителни цитокини и адипокини и генната експресия на някои от тях. Изследването е първото по рода си комплексно изследване върху биологичните ефекти на плодове от бязак.

**Annotation:** The aim of the scientific work is to analyze the protective, antioxidant, antiobesity and antidiabetic effect of *Sambucus ebulus* L. fruit extracts in different experimental models *in vitro* and *in vivo*. A phytochemical analysis of different extracts of *S. ebulus* fruits was performed and the concentrations of total polyphenols, anthocyanins, antioxidant (AO) activity of fruit extracts were determined depending on the type and concentration of the extractant. The cytotoxicity/cytoprotective effect of the *S. ebulus* extracts used in the cell culture experiments was investigated. The protective effect of *S. ebulus* fruit extracts on 3T3-L1 preadipocytes in conditions of *t*-ButOOH induced oxidative stress was investigated by analyzing the gene expression of proteins from the intracellular AO defense and those related to the inflammatory process. The protective effect of: ethyl acetate fraction of total methanolic extract of *S. ebulus* fruits on 3T3-L1

cells in conditions of ethanol-induced inflammation was also investigated, by analyzing the gene expression of proteins from intracellular AO protection and those related to inflammation; aqueous extract of *S. ebulus* fruits on J744A.1 macrophages under the condition of LPS-induced inflammation, by analyzing the transcription of intracellular AO defense and inflammation-related proteins, and the translation of pro-inflammatory and ER-related proteins stress. In an intervention involving healthy volunteers, the influence of *S. ebulus* fruit tea was investigated by analyzing serum AO activity, blood glucose levels, serum lipids, protein levels of pro-inflammatory cytokines and adipokines, and the gene expression of selected ones. The study is the first comprehensive study of its kind on the biological effects of dwarf elder berries.

### **Показател В3.** Хабилитационен труд – монография

**Оскан Бахидинов Тасинов.** Молекулни механизми на имуномодулиращото действие – основа за профилактичния и терапевтичен потенциал на *Sambucus ebulus* L., 2022, ISBN: 978-619-91772-2-8

**Анотация:** В съвременното ни билките са източник на ценни суровини за фармацевтичната индустрия в производството на лекарства и хранителни добавки, допринасящи за поддържане на човешкото здраве. Настоящият научен труд се фокусира върху имуномодулиращия потенциал на билките и изясняването на молекулните механизми, на които се базира това им действие, като се отделя специално внимание на научната литература, представяща молекулните механизми, на които се дължат биологичните ефекти на билката бязак (*Sambucus ebulus* L.). В настоящия труд е направен задълбочен анализ на имуномодулиращото му действие, като основа за неговия профилактичен и терапевтичен потенциал. С цел по-добро разбиране на тези молекулните механизми в монографията първо се разглеждат молекулните механизми на действие на ключови фитохимикали открити в плодове и други части на билката. Тези литературни анализи се съчетават с описание на ключови, потенциално прицелни метаболитни пътища лежащи в основата на имунният отговор и процеса на възпаление. Разнообразието от фитохимични съединения с широк потенциал на действие, които се съдържат в бязак, създават комбинации от синергично действащи компоненти, които са в основата на доказаните му в традиционната медицина и съвременна наука благотворни биологични ефекти. Имуномодулиращият потенциал на билката се осъществява на различни нива, засягайки транскрипцията на гени, транслацията на ключови белтъци, сред които антиоксидантни и провъзпалителни ензими и цитокини и регулация на активността на транскрипционни фактори. Сред ключови сигнални и метаболитни пътища, които билката модулира са тези на NF- $\kappa$ B, MAPK, p53, COX-2 и iNOS. Сред уникалните механизми на имуномодулиране от страна на плодовете се оказва контролът върху развитието на т.н. ER-стрес, който е в основата на състояния като хронично възпаление, инсулинова резистентност, диабет, ракови и невродегенеративни заболявания. Изследванията разкриват потенциала на бязак като ефективно средство в борбата срещу вируси, бактериални инфекции с резистентност към известни антибиотици, специфични

туморни заболявания, паразитни инфекции и хронични кожни възпаления. Монографията обобщава факти потвърждаващи приложението на билката в народната медицина, предполага включването на зрелите плодове през есенно-зимния период към диетата като хранителна добавка за мобилизиране на антиоксидантните и противовъзпалителни защитни сили на организма.

**Annotation:** Nowadays, herbs are a source of valuable raw materials for the pharmaceutical industry in the production of drugs and nutritional supplements contributing to the maintenance of human health. The present scientific work focuses on the immunomodulatory potential of herbs and the elucidation of the molecular mechanisms underlying this action, paying special attention to the scientific literature presenting the molecular mechanisms underlying the biological effects of the herb dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.). In the present work, an in-depth analysis of its immunomodulatory action is made, as a basis for its prophylactic and therapeutic potential. In order to better understand these molecular mechanisms, the monograph first examines the molecular mechanisms of action of key phytochemicals found in fruits and other parts of the herb. These literature analyzes are combined with a description of key target metabolic pathways involved in the immune response and the inflammatory process. The variety of phytochemical compounds with a wide potential of action, which are contained in dwarf elder, create combinations of synergistically acting components, which are the basis of its beneficial biological effects proven in traditional medicine and modern science. The herb's immunomodulatory potential occurs at different levels, affecting gene transcription, translation of key proteins, including antioxidant and proinflammatory enzymes and cytokines, and regulation of the activity of transcription factors. Among the key signaling and metabolic pathways that the herb modulates are those of NF- $\kappa$ B, MAPK, p53, COX-2, and iNOS. Among the unique mechanisms of immunomodulation by fruits is the control over the development of the so-called ER-stress, which underlies conditions such as chronic inflammation, insulin resistance, diabetes, cancer and neurodegenerative diseases. Research reveals the potential of dwarf elder as an effective agent in the fight against viruses, resistant to antibiotics bacterial infections, specific tumor diseases, parasitic infections and chronic skin inflammations. The monograph summarizes facts confirming the use of the herb in folk medicine, suggests the inclusion of ripe fruits in the autumn-winter period to the diet as a food supplement to mobilize the body's antioxidant and anti-inflammatory defenses.

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

**Г7-01.** 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 tert-Buthylhydroperoxyde induced cell toxicity. *Bulgarian Chemical Communications*, 2019, 51, A, 125 – 130. (Q4)

**Abstract:** Dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.) is a popular herb in Bulgarian folk medicine known for its antiseptic, anti-inflammatory 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 cell-protective 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 cell viability. All the other samples caused a gradual decrease in the cell viability. In order to measure their protective activity, extracts (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. *Sambucus* sp. плодовете са богати на биоактивни съединения, най-изобилни от които са полифеноли и особено антоцианини. Целта на настоящото изследване беше да се оцени *in vitro* пролиферативния и цитопротективен потенциал на екстракта от SE и неговата хидрофилна и обогатена с антоцианини фракция в условия на *t*-ButOOH индуцирана клетъчна смърт на J774A.1 макрофагова клетъчна линия. Тотален екстракт (ТЕ) и неговата хидрофилна (ХФ) и антоцианинова фракция (АФ) бяха анализирани *in vitro* за тяхното съдържание на полифеноли, флавоноиди и антоцианини и антиоксидантен капацитет. Цитопротективната активност на тези препарати е оценена в модел на *t*-ButOOH индуцирана цитотоксичност. ТЕ, ХФ и АФ бяха тествани в различни концентрации (0,5-64%, v/v). Най-ниската приложена концентрация на ХФ (0,5% v/v) причинява 6% значително увеличение на жизнеспособността на клетките. Всички останали проби причиняват постепенно намаляване на жизнеспособността на клетките. За да се измери тяхната защитна активност, екстрактът (0,5%, 2%, 8% и 32%, (v/v)) се прилага като предварителна обработка. Значително подобрение в клетъчната жизнеспособност на третирани с *t*-ButOOH клетки беше открито за всички екстракти, но най-видният ефект беше открит за ТЕ, последван от ХФ и АФ. ТЕ значително подобрява клетъчната жизнеспособност със 116, 230, 1165 и 1767%, съответно. По-нисък, но подобен е ефектът на хидроксилната и антоцианиновата фракция, където подобряването на клетъчната жизнеспособност е до 564% и 300%. Предварителното третиране с общ екстракт от *Sambucus ebulus* и неговите хидрофилни и антоцианинови фракции предпазва клетките J774A.1 в модел на индуцирана от *t*-ButOOH цитотоксичност.

**Г7-02.** Todorova M., **Tasinov O.**, Pasheva M., Kiselova-Kaneva Y., Galunska B. *Sambucus ebulus* extracts exhibit modulatory activity on inflammation and phagocytosis as revealed by changed gene expression in a model of LPS treated J774A.1 macrophages. *Bulgarian Chemical Communications*, 2020, 52, D, 142-148. (Q4)

**Abstract:** Dwarf elder, also known as elderberry (*Sambucus ebulus* L., SE) is a popular herb in Bulgarian folk medicine, known for its antiseptic, anti-inflammatory and diuretic action. Despite its wide application as anti-inflammatory and immune stimulatory remedy, there is no data on the possible protective effect of SE total extract (TE) or anthocyanin fraction (AF) under conditions of induced inflammation. The health benefits of consuming *S. ebulus* fruits that are rich in polyphenols, especially anthocyanins, have been the focus of an *in vitro* investigation. The aim of the present study was to evaluate the effect of SE fruit total extract and anthocyanin fraction on the expression of genes associated with the inflammatory response and phagocytosis in a model of LPS-stimulated J774A.1 macrophages. TE and the purified AF from *S. ebulus* fruits exhibited anti-inflammatory activity by reducing LPS-induced expression of TLR-4, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-1RN, CRP, COX-2 and iNOS. Stimulation of phagocytic enzymes NOX and MPO expression was also reduced by pretreatment with TE and AF. The results of the *in vitro* studies suggest a potential anti-inflammatory effect of the obtained fractions, which appear to modulate the expression of proteins directly related to control inflammatory processes: TLR-4, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-1RN, CRP, COX-2, iNOS, as well as enzymes associated with phagocytosis NOX and MPO.

**Резюме:** Бъзакът, известен още като малък бъз (*Sambucus ebulus* L., SE) е популярна билка в българската народна медицина, известна със своето антисептично, противовъзпалително и диуретично действие. Въпреки широкото му приложение като противовъзпалително и имуностимулиращо средство, няма данни за възможния протективен ефект на SE тотален екстракт (ТЕ) или антоцианиновата фракция (АФ) при условия на индуцирано възпаление. Ползите за здравето от консумацията на плодове на *S. ebulus*, които са богати на полифеноли, особено антоцианини, са били в центъра на *in vitro* изследване. Целта на настоящото изследване е да се оцени ефектът на ТЕ от SE плодове и АФ върху експресията на гени, свързани с възпалителния отговор и фагоцитозата в модел на LPS-стимулирани J774A.1 макрофаги. ТЕ и пречистеният АФ от плодовете на *S. ebulus* показват противовъзпалителна активност чрез намаляване на LPS-индуцираната експресия на TLR-4, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-1RN, CRP, COX-2 и iNOS. Стимулирането на експресията на фагоцитните ензими NOX и MPO също беше намалено, чрез предварително третиране с ТЕ и АФ. Резултатите от *in vitro* проучванията предполагат потенциален противовъзпалителен ефект на получените фракции, които изглежда модулират експресията на протеини, пряко свързани с контрола на възпалителните процеси: TLR-4, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-1RN, CRP, COX-2, iNOS, както и ензими, свързани с фагоцитозата NOX и MPO.

**Г7-03.** **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, D, 257-262. (Q4)

**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:** Микроскопични фотосинтетични цианопрокариоти/цианобактерии или синьо-зелени водорасли произвеждат различни видове биоактивни съединения, включително различни цианотоксини, които са опасни за екосистемата и човешкото здраве. Цианопрокариотите са широко разпространени на Земята и по-специално в България, където през последните две десетилетия техните токсини бяха открити в различни влажни зони. Въпреки това, само няколко проучвания, проведени в България, споменават цитотоксичните ефекти на водите, замърсени с цианотоксини, и до момента в тестовете са използвани само три вида клетъчни линии. Ето защо, настоящото изследване беше фокусирано върху цитотоксичния ефект на води от пет избрани български влажни зони (два резервоара и три езера) с доказано развитие на токсигенни цианопрокариоти. Освен това за първи път в страната е изследвана цитотоксичността върху линия Hs27 човешки кожни клетки. Извършен е МТТ тест за измерване на клетъчната жизнеспособност при излагане на нарастващи концентрации на водни проби в културална среда. По време на изследването бяха получени три важни резултата, които като цяло съответстват на цианопрокариотния състав, биомасата и откритите цианотоксини: 1) приложените водни проби показаха своя ефект след 24 часа експозиция; 2) при най-ниската концентрация от 1% не се наблюдават цитотоксични ефекти; 3) при концентрация от 8% в културалната среда, всички водни проби намаляват жизнеспособността на клетките 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.

**Г7-04. 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, D, 100-106. (Q4)

**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 Folin-Ciocalteu 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-diphenyltetrazoliumbromid reduction assay. Cells were treated with SE EAF dissolved in ethanol or ethanol only. Transcription levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), 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- Ct 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- $\beta$ -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- 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. Изследвахме противовъзпалителния потенциал на етилацетатната фракция на плодове SE (EAF) върху клетъчен модел на индуцирана от етанол цитотоксичност на 3Т3-Л1 преадипоцити. След фракциониране бяха измерени общото съдържание на полифеноли (ТП) с помощта на реагент Folin-Ciocalteu и тотален антиоксидантен капацитет (ТАС) чрез ABTS+ тест за обезцветяване на плодов екстракт и фракции от SE. Чрез тънкослойна хроматография се анализира наличието на избрани полифеноли. Клетъчната жизнеспособност беше тествана с помощта на 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиумбромиден редукиционен анализ. Клетките се третират с SE EAF, разтворен в етанол или само в етанол. Нивата на транскрипция на тумор некрозис фактор- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), интерлевкин 6 (IL-6), циклооксигеназа-



2 (COX-2), индуцируема азотен оксид синтаза (iNOS) и каталитична субединица на глутамат-цистеин лигаза (GCLc) бяха измерени с помощта на qPCR. Относителните нива на транскрипция са изчислени с помощта на 2-Ct метод. SE EAF показва най-високите ТП и ТАС сред анализирания екстракт. За първи път присъствието на хиперозид, изокверцетин, изорамнетин-3-О-β-глюкопиранозид и следи от рутин и 3,5-дикафеоилкунинова киселина са докладвани за SE EAF. SE EAF показва цитопротективен ефект, като увеличава жизнеспособността на клетките, потиснати от етанол, до 2,4 пъти (p<0,001). Третирането с SE EAF (0,02% w/v) намалява етанола-индуцираната генна експресия на iNOS, COX-2, TNF-α и GCLc съответно с 63% (p<0,01), 54% (p<0,001), 64% (p<0,01) и 65% (p<0,05), което показва противовъзпалителен потенциал на плодовия екстракт. По-ниската концентрация (0,01% w/v) на SE EAF намалява експресията на IL-6 и GCLc ген със 71% (p<0,01) и 45% (p<0,05), съответно. Това проучване предоставя първите научни доказателства за цитопротективния и противовъзпалителния потенциал на SE плодове EAF.

**Г7-05. 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, D, 72-64. (Q4)

**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-κB, 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 non-toxic. Salicylic acid (SA) as a positive control (25-200 μM) induced gradually cell proliferation by up to 15%. Real-Time PCR analysis revealed that SE FAI alone significantly up-regulated NF-κB, 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-κB and GPx by 70%, and GCLc by 37%. The effect of SE FAI/+LPS was similar to the effect of SA/+LPS. NF-κB 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. (бъзак) е замесен в борбата с оксидативния стрес при възпаление и клетъчна смърт. Целта бе да се анализира ефекта от водна инфузия от плодове бъзак в модел на индуцирана от липополизахариди (LPS) цитотоксичност в J774A.1 миши макрофаги. Анализирани са нивата на транскрипция на NF-κB, антиоксидантни ензими глутамат-цистеин лигаза, каталитична субединица (GCLc) и глутатион пероксидаза (GPx). Тестовите за клетъчна жизнеспособност показват, че LPS (25-200 ng/mL) причинява постепенна клетъчна смърт с до 14,5%, докато водна инфузия на плодове бъзак (0.625%-

12.5% в културална среда) е нетоксичен. Салициловата киселина (SA) като положителна контрола (25-200  $\mu\text{M}$ ) индуцира постепенно клетъчна пролиферация с до 15%. Анализът с PCR в реално време разкри, че самостоятелно водна инфузия на плодове бъзак значително повишава нивата на NF- $\kappa\text{B}$ , GPx и GCLc mRNA (съответно 3.8, 3.04 и 9.57 пъти). Предварителното третиране със водна инфузия на плодове бъзак значително намалява LPS (200 ng/mL)-стимулираната транскрипция на NF- $\kappa\text{B}$  и GPx със 70%, и GCLc с 37%. Ефектът на водна инфузия на плодове бъзак/+LPS е подобен на ефекта на SA/+LPS. Нивата на иРНК за NF- $\kappa\text{B}$  значително корелират с тези на GCLc ( $r=0,66$ ) и GPx ( $r=0,79$ ). Ние заключаваме, че водна инфузия на плодове бъзак може да прояви своите противовъзпалителни и антиоксидантни ефекти чрез промяна на транскрипцията на LPS-стимулиран оксидативен стрес и гени, свързани с възпаление.

**Г7-06.** Nazifova-Tasinova N., **Tasinov O.**, Ivanova D., Kiselova-Kaneva Y. Agrimonia eupatoria tea intake has the potential to change oxidative and inflammatory response of human PBMC to *ex vivo* LPS stimulation – an example of phenotypic flexibility modulation. *Bulgarian Chemical Communications*, 2020, 52, D, 174-181. (Q4)

**Abstract:** *Agrimonia eupatoria* L. (AE) is an herb widely used in the Bulgarian traditional medicine. Current study aims to assess the anti-inflammatory and antioxidant potential of the herb in an intervention study involving healthy volunteers. A model of bacterial lipopolysaccharide (LPS) *ex vivo* stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was used to analyse changes in expression of two pro-inflammatory (IL-1 $\beta$  and IL-6) and two antioxidant genes (GCLc and SOD1) after supplementation with agrimony tea for 25 days. The effect of BMI was also taken into consideration. LPS stimulation before intervention (Day 0) significantly stimulated IL-1 $\beta$  and IL-6 both in normal weight (NW) (3.7- and 14-fold, respectively,  $p<0.001$ ) and overweight (OW) (2.8- and 2.5-fold, respectively,  $p<0.05$ ) groups and of GCLc in NW (5 fold,  $p<0.001$ ). After the AE intervention (Day 25) LPS stimulation significantly increased IL-6 (3-fold,  $p<0.05$ ) and IL-1 $\beta$  (3-fold,  $p<0.001$ ) mRNA levels only in OW, while in the NW such effect was not observed. GCLc and SOD1 mRNA levels were not elevated at Day 25 both in NW and OW groups. We established that AE consumption resulted in significant decrease in LPS stimulated expression of IL-6 (7.6-fold,  $p<0.001$ ), IL-1 $\beta$  (3.8-fold,  $p<0.001$ ) and GCLc (3-fold,  $p<0.05$ ) gene expression only in NW. All these results confirm the anti-inflammatory potential of the herb. They also highlight the capability of NW subjects for a better adaptation after the agrimony intake since their PBMC manifested a better phenotypic flexibility in comparison to the OW subjects in *ex vivo* inflammatory conditions.

**Резюме:** *Agrimonia eupatoria* L. (AE) е билка, широко използвана в българската традиционна медицина. Настоящото проучване има за цел да оцени противовъзпалителния и антиоксидантен потенциал на билката в интервенционно проучване, включващо здрави доброволци. Модел на *ex vivo* стимулирани с бактериални липополизахарид (LPS) мононуклеарни клетки от периферна кръв (PBMC) беше използван за анализиране на

промените в експресията на два провъзпалителни (IL-1 $\beta$  и IL-6) и два антиоксидантни гена (GCLc и SOD1) след допълване с чай от агримония за 25 дни. Ефектът върху индекса на телесната маса (ИТМ) също беше взет под внимание. Стимулирането на LPS преди интервенция (ден 0) значително стимулира IL-1 $\beta$  и IL-6 както при нормално тегло (NW) (3,7 и 14 пъти, съответно,  $p < 0,001$ ), така и при наднормено тегло (OW) (2,8 и 2,5 пъти, съответно,  $p < 0,05$ ) групи и на GCLc в NW (5 пъти,  $p < 0,001$ ). След интервенцията на АЕ (ден 25) LPS стимулацията значително повишава транскрипционните нивата на IL-6 (3 пъти,  $p < 0,05$ ) и IL-1 $\beta$  (3 пъти,  $p < 0,001$ ) само в OW, докато в NW такъв ефект не се наблюдава. Нивата на транскрипция на GCLc и SOD1 не бяха повишени на ден 25 както в NW, така и в OW групите. Установихме, че консумацията на АЕ води до значително намаляване на LPS стимулираната експресия на IL-6 (7,6 пъти,  $p < 0,001$ ), IL-1 $\beta$  (3,8 пъти,  $p < 0,001$ ) и GCLc (3 пъти,  $p < 0,05$ ) генна експресия само в NW. Всички тези резултати потвърждават противовъзпалителния потенциал на билката. Те също така подчертават способността на NW субектите за по-добра адаптация след приема на агримония, тъй като техните РВМС проявяват по-добра фенотипна пластичност в сравнение с OW субектите при *ex vivo* възпалителни състояния.

**Г7-07.** Sokrateva T., Roussev B., Nashar M., Kiselova-Kaneva Y., Mihaylova G., Todorova M., Pasheva M., **Tasinov O.**, Nazifova-Tasinova N., Vankova D., Ivanova D.P., Radanova M., Galunska B., Vlaykova T., Ivanova D.G. 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. DOI: 10.1080/13813455.2019.1638416 (Q1)

**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 analyzing possible antioxidative 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  $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl ligase (GCL) and sICAM-1 genes was also analyzed.

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:

**Въведение:** Серните минерални води (СМВ) 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 провъзпалителни ефекти.

**Материали и методи:** Проведена е интервенция с варненски прием на СМВ със здрави доброволци. Бяха измерени общи тиоли, общ глутатион и неговите фракции, реактивни кислородни метаболити, малондиалдехид, вътреклетъчна адхезионна молекула (ICAM-1) и съдова клетъчна адхезионна молекула (VCAM-1). Експресията на  $\gamma$ -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. GCL и sICAM-1 генните експресии бяха увеличени след интервенцията.

**Заключение:** консумацията на СМВ подобрява редокс статуса на тялото. Предполагаме, че тези благоприятни ефекти могат да се дължат на установените високи нива на сяра съдържащи съединения във варненската минерална вода.

**Г7-08.** Radanova M., Mihaylova G., Mihaylova Z., Ivanova D., **Tasinov O.**, Nazifova-Tasinova N., Pavlov P., Mirchev M., Conev N. and Donev I. Circulating miR-618 Has Prognostic Significance in Patients with Metastatic Colon Cancer. *Current Oncology*, 2021, 28(2):1204-1215. <https://doi.org/10.3390/currenocol28020116> (Q2)

**Abstract:** The present study evaluated the prognostic role of circulating miRNA-618 in patients with metastatic colon cancer (mCC) and whether miR-618 gene rs2682818 single nucleotide polymorphisms (SNP) are associated with colon cancer susceptibility and expression levels of mature miR-618. In total, 104 patients with mCC before starting the chemotherapy were investigated. The expression status of circulating miR-618 in mCC was evaluated by quantitative PCR. TaqMan PCR assay was used for rs2682818 SNP genotyping. miR-618 was overexpressed in serum of mCC patients. Patients with high and intermediate expression of miR-618 had a significantly longer mean overall survival (OS) of 21 months than patients with low expression—16 months. In addition, multivariate Cox regression analysis confirmed the association between high/intermediate levels of miRNA-618 and longer OS, HR = 0.51, 95% CI: 0.30–0.86, p = 0.012. miR-618 rs2682818 SNP significantly decreased the risk of colon cancer susceptibility in both heterozygous codominant (AC vs. CC, OR = 0.39, 95% CI: 0.17–0.88, p = 0.024) and overdominant (AC vs. CC + AA, OR = 0.37, 95% CI: 0.16–0.85, p = 0.018) genetic models. Our data suggest that circulating miRNA-618 could be useful as a prognostic biomarker in mCC. Patients harboring AC rs2682818 genotype have a decreased risk for colon cancer in comparison with patients with CC and AA genotypes.

**Резюме:** Настоящото проучване оценява прогностичната роля на циркулиращата miRNA-618 при пациенти с метастатичен колоректален карцином (КК) и дали rs2682818 единични нуклеотидни полиморфизми (SNP) на miR-618 гена са свързани с податливостта към КК и

нивата на експресия на зрял miR-618. Общо са изследвани 104 пациенти с метастатичен КК преди започване на химиотерапията. Състоянието на експресия на циркулиращия miR-618 в метастатичен КК беше оценено чрез количествена PCR. TaqMan PCR анализ беше използван за rs2682818 SNP генотипиране. miR-618 е свръхекспресиран в серума на пациенти с метастатичен КК. Пациентите с висока и междинна експресия на miR-618 са имали значително по-дълга средна обща преживяемост (ОП) от 21 месеца, отколкото пациентите с ниска експресия - 16 месеца. В допълнение, мултивариантният регресионен Cox анализ потвърждава връзката между високите/средните нива на miRNA-618 и по-дългата ОП, HR = 0,51, 95% CI: 0,30–0,86, p = 0,012. miR-618 rs2682818 SNP значително намалява риска от чувствителност към рак на дебелото черво както при хетерозиготен кодоминант (АС спрямо СС, OR = 0,39, 95% CI: 0,17–0,88, p = 0,024), така и при свръхдоминантен (АС срещу СС + АА, OR = 0,37, 95% CI: 0,16–0,85, p = 0,018) генетични модели. Нашите данни предполагат, че циркулиращата miRNA-618 може да бъде полезна като прогностичен биомаркер при метастатичен КК. Пациентите с генотип АС rs2682818 имат намален риск от рак на дебелото черво в сравнение с пациентите с генотипове СС и АА.

**Г7-09.** Radanova M., Mihaylova G., Nazifova-Tasinova N., Levkova M., **Tasinov O.**, Ivanova D., Mihaylova Z., Donev I. Oncogenic Functions and Clinical Significance of Circular RNAs in Colorectal Cancer. *Cancers*. 2021, 13(14):3395. <https://doi.org/10.3390/cancers13143395> (Q1)

**Abstract:** Colorectal cancer (CRC) is ranked as the second most commonly diagnosed disease in females and the third in males worldwide. Therefore, the finding of new more reliable biomarkers for early diagnosis, for prediction of metastasis, and resistance to conventional therapies is an important challenge in overcoming the disease. The current review presents circular RNAs (circRNAs) with their unique features as potential prognostic and diagnostic biomarkers in CRC. The review highlights the mechanism of action and the role of circRNAs with oncogenic functions in the CRC as well as the association between their expression and clinicopathological characteristics of CRC patients. The comprehension of the role of oncogenic circRNAs in CRC pathogenesis is growing rapidly and the next step is using them as suitable new drug targets in the personalized treatment of CRC patients.

**Резюме:** Колоректалният карцином (КПК) е класиран като второто най-често диагностицирано заболяване при жените и третото при мъжете в света. Следователно намирането на нови по-надеждни биомаркери за ранна диагностика, за прогнозиране на метастази и резистентност към конвенционалните терапии е важно предизвикателство за преодоляване на заболяването. Настоящият преглед представя кръговите РНК (circRNAs) с техните уникални характеристики като потенциални прогностични и диагностични биомаркери в КПК. Прегледът подчертава механизма на действие и ролята на circRNA с онкогенни функции в КПК, както и връзката между тяхната експресия и клинично-патологичните характеристики на пациенти с КПК. Разбирането на ролята на онкогенните

circRNAs в патогенезата на КПК нараства бързо и следващата стъпка е използването им като подходящи нови лекарствени таргети при персонализираното лечение на пациенти с КПК.

**Г7-10. Tasinov O.,** Kiselova-Kaneva Y., Ivanova D., Pasheva M., Vankova D. and Ivanova D. Ferrum phosphoricum D12 Treatment Affects J774A.1 Cell Proliferation, Transcription Levels of Iron Metabolism, Antioxidant Defense, and Inflammation-related Genes. *Homeopathy*, 2021, 111(2):113-120. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1731312> (Q2)

**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  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  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,  $p < 0.01$ ),  $\beta$ -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 ( $r = 0.99$ ,  $p < 0.05$ ) 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 $\beta$  (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 в разреждане D12 върху клетъчната пролиферация и транскрипцията на гени свързани с метаболизма на желязото, антиоксидантната защита и възпалението в миши J774A.1 макрофаги.

Методи: Клетъчната пролиферация се изследва с помощта на MTT тест. Бяха извършени RT-qPCR анализи за оценка на промените в генната експресия. Относителните нива на гена

експресия се изчисляват с помощта на метода  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Ефектът от лечението с FP D12 таблетки е сравнен с този с плацебо таблетки (ПТ).

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 нетретирани клетки и с до 40% ( $p < 0,01$ ) спрямо третирани с ПТ клетки в съответната концентрация. FP D12 спрямо ПТ индуцира значително повишаване на експресията на иРНК на леката верига на феритин (Ftl1) (с 8 пъти,  $p < 0,01$ ),  $\beta$ -2-микроглобин (B2m) (с 2,5 пъти,  $p < 0,05$ ) и желязо-чувствителен елемент свързващ протеин 2 (Ireb2) (с 4 пъти,  $p < 0,05$ ) и леко понижава нивата на транскрипция 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. Наблюдава се значително стимулиране на антиоксидантния ензим Grx-1 (с 1,27 пъти,  $p < 0,01$ ) в клетките с 0,025 mg/mL FP D12, но леко намаление (с 0,12 пъти,  $p < 0,05$ ) в клетките, третирани с 0,0125 mg/mL. Установено е също значително повишаване на генната експресия на IL-1 $\beta$  (с 3,5 пъти,  $p < 0,05$ ) в макрофаги.

Заключение: *Ferrum phosphoricum* в D12 разреждане потенциално проявява желязо задържаща, антиоксидантна и имуномодулираща активност, вероятно чрез модулиране на нивата на транскрипция на свързаните с тези активности гени в нестимулирани миши макрофаги.

**Г7-11. Tasinov O.,** Dincheva I., Badjakov I., Kiselova-Kaneva Y., Galunska B., Nogueiras R. and Ivanova D. Phytochemical composition, anti-Inflammatory and ER stress-reducing potential of *Sambucus ebulus* L. fruit extract. *Plants*, 2021, 10 (11):2446. <https://doi.org/10.3390/plants10112446> (Q1)

**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 extracts (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 $\alpha$ , Ccl2, COX2 and iNOS transcription, without inducing ER stress. SE FAE suppressed the LPS-induced transcription of inflammation related genes (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , Ccl2, Icam-1, Fabp4, COX2, iNOS, Nox1, IL-1ra, Sirt-1) and reduced the protein levels of iNOS, p $\epsilon$ IF2 $\alpha$ , ATF6 $\alpha$  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 бъзак (*Sambucus ebulus* L.) се използват заради техния имуностимулиращ, хемопоетичен и антивирусен потенциал. В настоящето изследване се фокусирахме върху анализирането на механизма, който е в основата на имуномодулащите и противовъзпалителни ефекти на воден екстракт от плодове на бъзак, с внимание към неговия потенциал за намаляване на стреса в ендоплазмения ретикулум (ER). J774A.1 макрофаги бяха третирани само с воден екстракт от плодове на бъзак или в условия на липополизахаридна (LPS) стимулация. Използвайки GC-MS и LC-MS/MS, неговият фитохимичен състав беше анализиран. За измерване на нивата на транскрипция и протеини използвахме съответно qPCR и Western blot. Преобладаващите фитохимикали в воден екстракт от плодове на бъзак са хидроксиканелени киселини, проантоцианидини и антоцианини. Съдържанието на някои аминокиселини, органични киселини, алкохоли, мастни киселини и естери беше също докладвано. Екстрактът проявяват имуностимулиращ потенциал, чрез стимулиране на транскрипцията на IL-6, TNF $\alpha$ , Ccl2, COX2 и iNOS, без да предизвикват ER стрес. Воден екстракт от плодове на бъзак потиска LPS-индуцираната транскрипция на свързани с възпаление гени (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , Ccl2, Icam-1, Fabp4, COX2, iNOS, Nox1, IL-1ra, Sirt-1) и намалява нивата на протеините iNOS, p $\text{eIF}2\alpha$ , ATF6 $\alpha$  и CHOP. Ефектите са сравними с тези на салициловата киселина. Бъзакът потиска LPS-стимулираните възпалителни маркери на нива транскрипция и транслация. Повлияването на ER стрес е вероятно друг механизъм, който е в основата на неговия противовъзпалителен потенциал. Тези констатации разкриват потенциала на плодовете бъзак като благоприятно средство за лечение на възпалителни и патологични състояния, свързани с развитието на ER стрес.

**Г7-12.** Hristova M, **Tasinov O.**, Tzaneva M., Chivchibashi D., Kiselova-Kaneva Y., Bekyarova G. Effect of melatonin on gastric antioxidant defense in experimental burn trauma. *Veterinarni Medicina*, 67, 2022. <https://doi.org/10.17221/109/2021-VETMED> (Q3)

**Abstract:** Severe burn trauma triggers oxidative gastric mucosal injury. The purpose of this study was to investigate the antioxidant defense mechanisms and protective effect of melatonin in the gastric mucosa after burn injury. In order to investigate the mechanisms involved in the gastric antioxidant defense 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 defense by augmenting the Cu/Zn SOD activity.

**Резюме:** Тежка 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, бяха приложени qPCR в реално време и имунохистохимични техники. 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 се прилага незабавно и 12 часа след изгаряне на 30% от общата повърхност на тялото. Изгарянето значително повишава генната експресията на Gpx4 ( $p < 0.0001$ ) и Gsr ( $p < 0.0001$ ). То също има и лек положителен ефект върху транскрипцията на Cat и активността на Cu/Zn SOD. Мелатонинът, от своя страна, значително усилва индуцираната от изгаряне активност на Cu/Zn SOD ( $p < 0.0001$ ), и понижава индуцираната експресия на Gpx4 ( $p < 0.0001$ ) и Gsr ( $p < 0.0001$ ) и инхибира нивото на Cat. В заключение, настоящото проучване предполага, че изгарянето адаптивно повишава активността на Cu/Zn SOD и повишава експресията на Gpx4 и Gsr гена в стомашната лигавица. Мелатонинът ефективно модулира експресията на клетъчните антиоксидантни ензими и подобрява антиоксидантната защита, чрез увеличаване на активността на Cu/Zn SOD.

**Г7-13.** Dimaras P., **Tasinov O.**, Ivanova D.P., Kiselova-Kaneva Y., Stefanova N., Tzaneva M., Ivanova D.G. Improving gene expression analysis efficacy from formalin-fixed paraffin embedded tissues. *Folia Medica* 2022, 64(4 ):602-608. doi: 10.3897/folmed.64.e63599 (Q4)

**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: Нуждата от подобряването на техниките за изолиране на РНК и кДНК синтез се появи със задълбочаващите се познанията за молекулярната основа на повечето заболявания. 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 биопсична тъкан, фиксирана във формалин, вградена в парафин (FFPE) и обработена чрез различни стратегии за синтез на кДНК, за да се улесни изследването на генната експресия.

Материали и методи: Сравнените методи за екстракция на РНК бяха: лизисен буфер, фенол базирана екстракция и комбинация от двете с едновременна употреба на колони за изолация на РНК на основата на силициев диоксид. Количеството и чистотата на РНК се оценяват спектрофотометрично. Бяха приложени различни стратегии за праймиране за синтез на кДНК: олиго dT; комбинация от олиго dT и произволен хексамерен; ген специфичен праймер. Беше извършена двустъпков RT-qPCR на рибозомален протеин L37A върху предварително амплифицирани и неамплифицирани кДНК матрици.

Резултати: Комбинацията от лизисен буфер с фенол базирана екстракция дава по-висок добив на РНК. Чрез извършване на предварително амплификация на кДНК, конфиденцията на откриване, чрез qPCR беше повишена и ефективността беше подобрена. Предварително амплифициране на матрицата увеличи чувствителността на анализа.

Заключения: Заедно комбинацията от подходи подобри значително възпроизводимостта и валидността на qPCR анализа на FFPE тъкани.

## **II. Пълнотекстови публикации в научни списания и сборници, извън минималните наукометрични изисквания за заемане на АД „доцент“**

1. Nazifova-Tasinova N., **Tasinov O.**, Pasheva M., Ivanova D., Kiselova-Kaneva Y. 2015. Peripheral blood mononuclear cells isolated from normal weight and overweight subjects differentially respond to lipopolysaccharides stimulation. *Science & Technologies*, V 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≥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-1β and IL-6 genes both in NW (p<0.001) and OW group (p<0.05). IL-1β 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-1β 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-1β – 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-1β 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 с изследователски цели при интервенции. 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: субекти с нормално тегло с BMI<25 (NW) и субекти с наднормено тегло с BMI≥25 (OW). Експресията на два провъзпалителни гена беше измерена, за да се провери възпалителният отговор при LPS стимулация.

Третирането с LPS ефективно индуцира възпалителен отговор в PBMCs чрез повишение в нивата на иРНК на IL-1β и IL-6 гени както в NW (p<0.001), така и в OW групата (p<0.05). Нивата на IL-1β mRNA надвишават тези на IL-6 както в контролните, така и в третираните с LPS PBMC на NW и OW групите (p<0,001). Нашите измервания не установиха значителна разлика между NW и OW групата по отношение на първоначалните нива на IL-1β и IL-6. Освен това, PBMC от OW групата реагират по-слабо след LPS стимулация - нивата на иРНК на IL-6 в OW групата са със 73% (p<0.001), а тези на IL-1β 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 пряно изолирани и култивирани PBMC от NW и OW индивиди. Генната индукция в NW групата е по-забележима. Въпреки че нивата на иРНК на IL-1β винаги са били по-високи от IL-6, последният реагира по-отчетливо на третирането.

2. Pasheva M., Nashar M., **Tasinov O.**, Nazifova-Tasinova N., Ivanova D. 2016. Effects of mulberry heartwood infusion on *t*-ButOOH-induced expression of proinflammatory genes in macrophage cell culture. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*, V 3 (1), 42-48.

**Abstract:** Oxidative stress is a key factor in the induction of chronic inflammation by activation of a variety of transcription factors and proinflammatory cytokines, which in turn could mediate different chronic pathological conditions. In the present study *Morus nigra* heartwood ethanol infusion was applied to oxidatively stimulated macrophage cells with the aim to investigate the effect of the plant on the expression of genes involved in proinflammatory response. The infusion markedly reduced the mRNA levels of the nuclear factor kB (NF-kB), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in a concentration-dependent manner. These results are a new contribution to the knowledge about the therapeutic potential of the mulberry tree, especially about its poorly examined heartwood.

**Резюме:** Оксидативният стрес е ключов фактор в индуцирането на хронично възпаление, чрез активиране на различни транскрипционни фактори и провъзпалителни цитокини, които от своя страна могат да медиат различни хронични патологични състояния. В настоящото изследване инфузията с етанол от сърцевината на *Morus nigra* се прилага към окислително стимулирани макрофаги с цел да се изследва ефектът на растението върху експресията на гени участващи в провъзпалителния отговор. Инфузията значително намалява нивата на иРНК на ядрения фактор kB (NF-kB), на туморната некрозис фактора  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) и интерлевкин-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) по начин, зависим от концентрацията. Тези резултати са нов принос към знанията за терапевтичния потенциал на черницата, особено за нейната слабо проучена сърцевина.