

Резюмета на рецензираните публикации на доц. Таня Топузова-Христова за конкурс за академичната длъжност „професор“

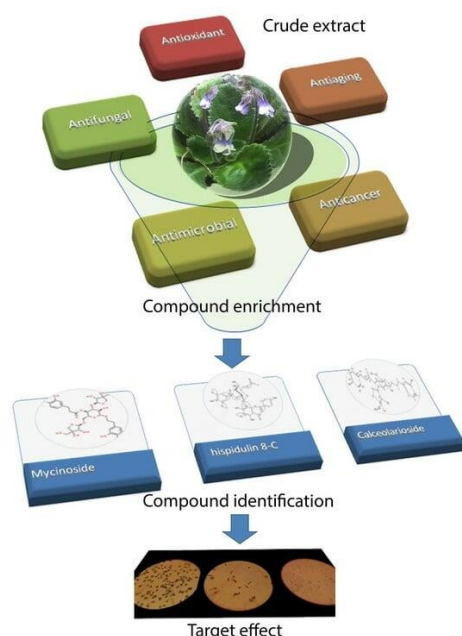
Публикации от група Б

01. Resurrection Plants—A Valuable Source of Natural Bioactive Compounds: From Word-of-Mouth to Scientifically Proven Sustainable Use

by Dimitar Djilianov, Daniela Moyankova, Petko Mladenov, Tanya Topouzova-Hristova, Aneliya Kostadinova, Galya Staneva, Diana Zasheva, Strahil Berkov and Lyudmila Simova-Stoilova

Metabolites **2024**, 14(2), 113; <https://doi.org/10.3390/metabo14020113>

Abstract



Resurrection plant species are a group of higher plants whose vegetative tissues are able to withstand long periods of almost full desiccation and recover quickly upon rewatering. Apart from being a model system for studying desiccation tolerance, resurrection plant species appear to be a valuable source of metabolites, with various areas of application. A significant number of papers have been published in recent years with respect to the extraction and application of bioactive compounds from higher resurrection plant species in various test systems. Promising results have been obtained with respect to antioxidative and antiaging effects in various test systems, particularly regarding valuable anticancer effects in human cell lines. Here, we review the latest advances in the field and propose potential mechanisms of action of

myconoside—a predominant secondary compound in the European members of the Gesneriaceae family. In addition, we shed light on the possibilities for the sustainable use of natural products derived from resurrection plants.

Абстракт

Възкръсващите растителни видове са група висши растения, чиито вегетативни тъкани са в състояние да издържат на дълги периоди на почти пълно изсъхване и се възстановяват бързо при повторно хидратиране. Освен че са моделна система за изследване на толерантността към изсушаване, видовете възкръсващи растения изглеждат ценен източник на метаболити с различни области на приложение. През последните години бяха публикувани значителен брой статии по отношение на екстракцията и прилагането на биоактивни съединения от възкръсващи растителни

видове в различни моделни системи. Бяха получени обещаващи резултати по отношение на антиоксидантните ефекти и ефектите против стареене в различни тестови системи, особено по отношение на ценните противоракови ефекти в човешки клетъчни линии. Тук правим преглед на най-новите постижения в тази област и предлагаме потенциални механизми на действие на миконозид - преобладаващ вторичен метаболит в европейските членове на семейство Gesneriaceae. В допълнение, ние хвърляме светлина върху възможностите за устойчиво използване на естествени продукти, получени от възкръсващи растения.

02. An Overview of Biofilm-Associated Infections and the Role of Phytochemicals and Nanomaterials in Their Control and Prevention

by Tsvetozara Damyanova, Petya D. Dimitrova, Dayana Borisova, Tanya Topouzova-Hristova, Emi Haladjova and Tsvetelina Paunova-Krasteva

Pharmaceutics **2024**, *16*(2), 162; <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16020162>

Abstract

Biofilm formation is considered one of the primary virulence mechanisms in Gram-positive and Gram-negative pathogenic species, particularly those responsible for chronic infections and promoting bacterial survival within the host. In recent years, there has been a growing interest in discovering new compounds capable of inhibiting biofilm formation. This is considered a promising antivirulence strategy that could potentially overcome antibiotic resistance issues. Effective antibiofilm agents should possess distinctive properties. They should be structurally unique, enable easy entry into cells, influence quorum sensing signaling, and synergize with other antibacterial agents. Many of these properties are found in both natural systems that are isolated from plants and in synthetic systems like nanoparticles and nanocomposites. In this review, we discuss the clinical nature of biofilm-associated infections and some of the mechanisms associated with their antibiotic tolerance. We focus on the advantages and efficacy of various natural and synthetic compounds as a new therapeutic approach to control bacterial biofilms and address multidrug resistance in bacteria.

Резюме

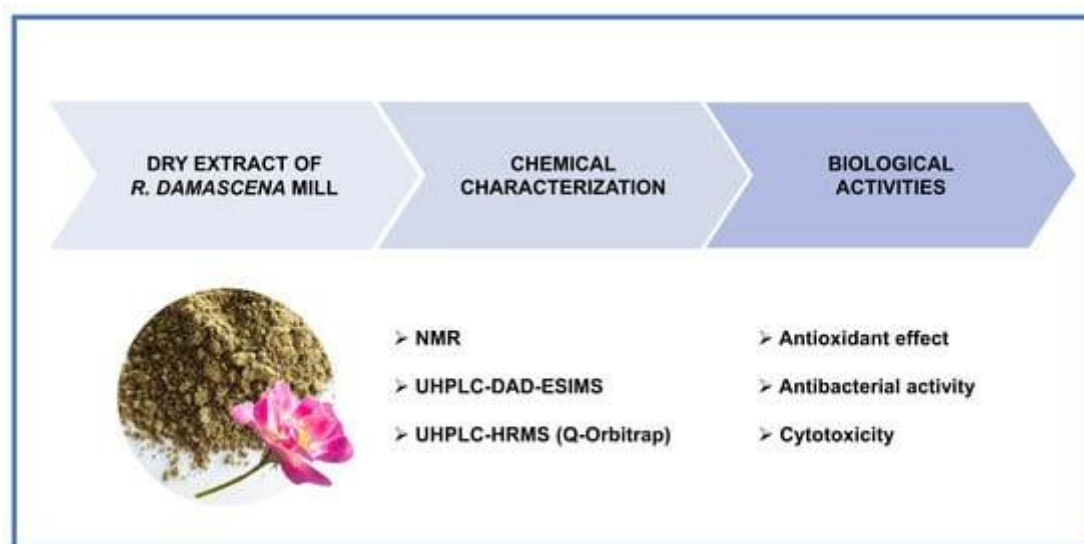
Образуването на биофилм се счита за един от основните механизми на вирулентност при грам-положителни и грам-отрицателни патогенни видове, особено тези, отговорни за хронични инфекции, както и начин за оцеляването на бактериите в гостоприемника. През последните години има нарастващ интерес към откриването на нови съединения, способни да инхибират образуването на биофилм. Това се счита за обещаваща антивирулентна стратегия, която потенциално би могла да преодолее проблемите с антибиотичната резистентност. Ефективните антибиофилмни агенти трябва да притежават отличителни свойства. Те трябва да бъдат структурно уникални, да позволяват лесно навлизане в клетките, да влияят на сигнализацията за кворум сенсинг

и да имат синергизъм с други антибактериални агенти. Много от тези свойства се откриват както в естествени продукти, които са изолирани от растенията, така и в синтетични системи като наночастици и нанокompозити. В този преглед обсъждаме клиничната природа на инфекциите, свързани с биофилми, и някои от механизмите, свързани с тяхната антибиотична толерантност. Ние се фокусираме върху предимствата и ефикасността на различни естествени и синтетични съединения като нов терапевтичен подход за контрол на бактериалните биофилми и справяне с мулти-лекарствената резистентност при бактериите.

03. Phytochemical Profile, Antioxidant Potential, Antimicrobial Activity, and Cytotoxicity of Dry Extract from *Rosa damascena* Mill

by Antoaneta Trendafilova, Plamena Staleva, Zhanina Petkova, Viktoria Ivanova, Yana Evstatieva, Dilyana Nikolova, Iliyana Rasheva, Nikola Atanasov, Tanya Topouzova-Hristova, Ralitsa Veleva, Veselina Moskova-Doumanova, Vladimir Dimitrov and Svetlana Simova

Molecules **2023**, *28*(22), 7666; <https://doi.org/10.3390/molecules28227666>



Abstract

Dry rose extract (DRE) obtained industrially by aqueous ethanol extraction from *R. damascena* flowers and its phenolic-enriched fraction, obtained by re-extraction with ethyl acetate (EAE) were the subject of this study. ^1H NMR of DRE allowed the identification and quantitation of fructose and glucose, while the combined use of HPLC-DAD-ESIMS and HPLC-HRMS showed the presence of 14 kaempferol glycosides, 12 quercetin glycosides, 4 phenolic acids and their esters, 4 galloyl glycosides, 7 ellagitannins, and quinic acid. In addition, the structures of 13 of the flavonoid glycosides were further confirmed by NMR. EAE was found to be richer in TPC and TFC and showed better antioxidant activity (DPPH, ABTS, and FRAP) compared to DRE. Both extracts displayed significant activity against *Propionibacterium acnes*,

Staphylococcus aureus, and *S. epidermidis*, but showed no activity against *Candida albicans*. Toxicity tests on normal human skin fibroblasts revealed low toxicity for both extracts with stronger effects observed at 24 hours of treatment that were compensated for over the following two days. Human hepatocarcinoma (HepG2) cells exhibited an opposite response after treatment with a concentration above 350 µg/mL for EAE and 500 µg/mL for DRE, showing increased toxicity after the third day of treatment. Lower concentrations were non-toxic and did not significantly affect the cell cycle parameters of either of the cell lines.

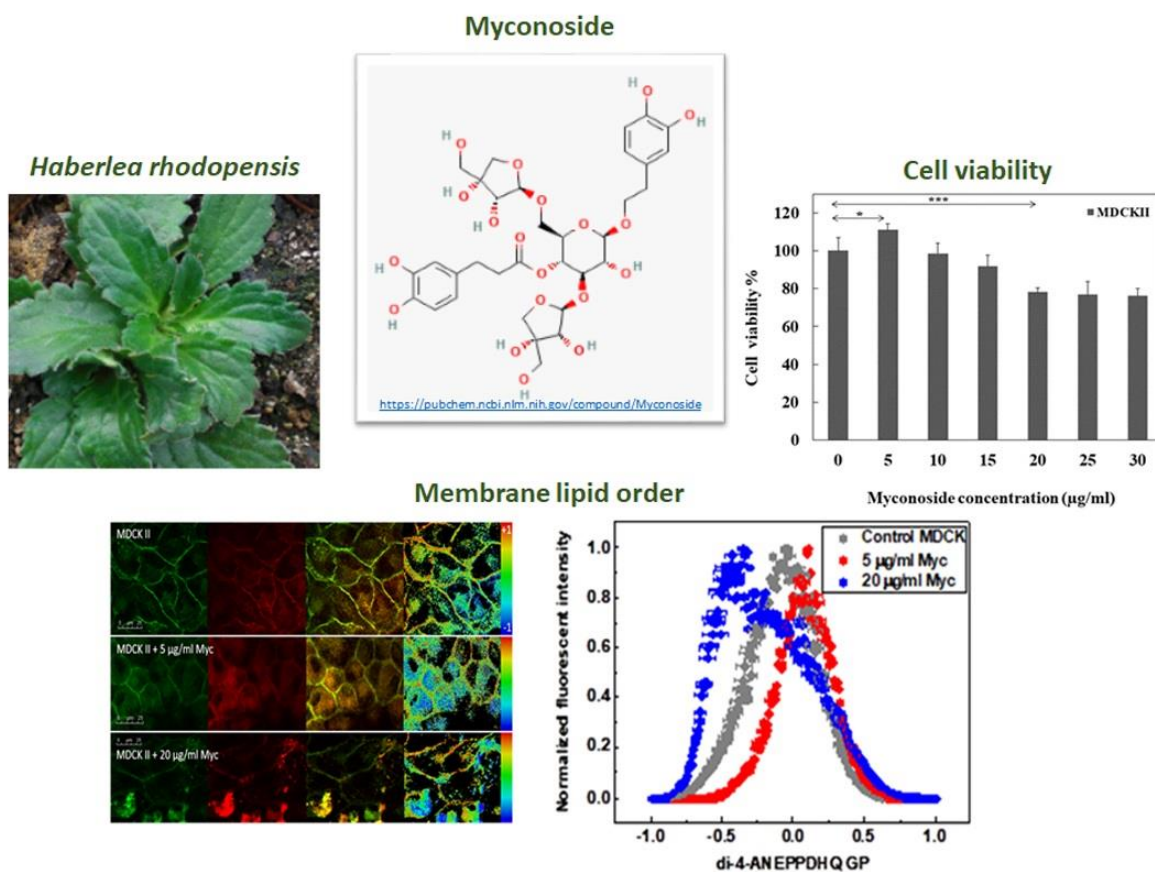
Резюме

Обект на това изследване бяха сух екстракт от роза (DRE), получен промишлено чрез екстракция с воден етанол от цветове на *R. damascena* и неговата обогатена с фенолни съединения фракция, получена чрез повторна екстракция с етил ацетат (EAE). Протонният ядрено магнитен резонансен анализ (¹H NMR) на DRE позволи идентифицирането и количественото определяне на фруктоза и глюкоза, докато комбинираното използване на HPLC-DAD-ESIMS и HPLC-HRMS показва наличието на 14 кемпферол гликозида, 12 кверцетин гликозида, 4 фенолни киселини и техните естери, 4 галоил гликозида, 7 елагитанини и хининова киселина. В допълнение, структурите на 13 от флавоноидните гликозиди бяха допълнително потвърдени от ЯМР. Установено е, че EAE е по-богат на общи фенолни (TPC) и общи флавоноидни (TFC) съединения и показва по-добра антиоксидантна активност (DPPH, ABTS и FRAP) в сравнение с DRE. И двата екстракта показват значителна активност срещу *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* и *S. epidermidis*, но не показват активност срещу *Candida albicans*. Тестовите за токсичност върху нормални човешки кожни фибробласти разкриха ниска токсичност и за двата екстракта с по-силни ефекти, наблюдавани след 24 часа от третирането, които бяха компенсирани през следващите два дни. Клетките от човешки хепатокарцином (HepG2) показват противоположен отговор след третиране с концентрация над 350 µg/mL за EAE и 500 µg/mL за DRE, показвайки повишена токсичност след третия ден от третирането. По-ниските концентрации са нетоксични и не повлияват значително параметрите на клетъчния цикъл нито на една от клетъчните линии.

04. Myconoside Affects the Viability of Polarized Epithelial MDCKII Cell Line by Interacting with the Plasma Membrane and the Apical Junctional Complexes

by Aneliya Kostadinova, Galya Staneva, Tanya Topouzova-Hristova, Daniela Moyankova, Vesela Yordanova, Ralitsa Veleva, Biliانا Nikolova, Albena Momchilova, Dimitar Djilianov and Rusina Hazarsova

Separations **2022**, 9(9), 239; <https://doi.org/10.3390/separations9090239>



Abstract

The phenyl glycoside myconoside, extracted from Balkan endemic *Haberlea rhodopensis*, has a positive effect on human health, but the exact molecular mechanism of its action is still unknown. The cell membrane and its associated junctional complex are the first targets of exogenous compound action. We aimed to study the effect of myconoside on membrane organization and cytoskeleton components involved in the maintenance of cell polarity in the MDCKII cell line. By fluorescent spectroscopy and microscopy, we found that at low concentrations, myconoside increases the cell viability by enhancing membrane lipid order and adherent junctions. The opposite effect is observed in high myconoside doses. We hypothesized that the cell morphological and physicochemical changes of the analyzed cell compartments are directly related to cell viability and cell apical-basal polarity. Our finding contributes to a better understanding of the beneficial application of phytochemical myconoside in pharmacology and medicine.

Резюме

Фенил гликозидът миконозид, извлечен от балканския ендемит силивряк (*Haberlea rhodopensis*), има положителен ефект върху човешкото здраве, но точният молекулярен механизъм на действието му все още не е известен. Клетъчната мембрана и свързаните с нея контактни комплекси са първите мишени на действието на едно екзогенно съединение. Имахме за цел да проучим ефекта на миконозида върху мембранната

организация и компонентите на цитоскелета, участващи в поддържането на клетъчната полярност в клетъчната линия MDCKII. Чрез флуоресцентна спектроскопия и микроскопия открихме, че при ниски концентрации миконозидът повишава жизнеспособността на клетките чрез подобряване на подредбата на мембранните липиди и адхезионните контакти. Обратен ефект се наблюдава при високи дози миконозид. Ние предположихме, че морфологични и физикохимични промени на анализиранияте клетъчни структури са пряко свързани с жизнеспособността на клетките и клетъчната апикално-базална полярност. Нашето откритие допринася за по-доброто разбиране на полезното приложение на фитохимикалът миконозид във фармакологията и медицината.

05. Myconoside interacts with the plasma membranes and the actin cytoskeleton and provokes cytotoxicity in human lung adenocarcinoma A549 cells

by Aneliya Kostadinova, Rusina Hazarosova, Tanya Topouzova-Hristova, Daniela Moyankova, Vesela Yordanova, Ralitsa Veleva, Biliانا Nikolova, Albena Momchilova, Dimitar Djilianov, Galya Staneva

J Bioenerg Biomembr **54**, 31–43 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10863-021-09928-x>

Abstract

Studies have been carried out on the effects of the phenyl glycoside myconoside, extracted from the relict, Balkan endemic resurrection plant *Haberlea rhodopensis* on the plasma membrane structural organization and the actin cytoskeleton. Because the plasma membrane is the first target of exogenous bioactive compounds, we focused our attention on the influence of myconoside on the membrane lipid order and actin cytoskeleton in human lung adenocarcinoma A549 cells, using fluorescent spectroscopy and microscopy techniques. We found that low myconoside concentration (5 µg/ml) did not change cell viability but was able to increase plasma membrane lipid order of the treated cells. Higher myconoside concentration (20 µg/ml) inhibited cell viability by decreasing plasma membrane lipid order and impairing actin cytoskeleton. We hypothesize that the observed changes in the plasma membrane structural organization and the actin cytoskeleton are functionally connected to cell viability. Biomimetic membranes were used to demonstrate that myconoside is able to reorganize the membrane lipids by changing the fraction of sphingomyelin-cholesterol enriched domains. Thus, we propose a putative mechanism of action of myconoside on A549 cells plasma membrane lipids as well as on actin filaments in order to explain its cytotoxic effect at high myconoside concentration.

Резюме

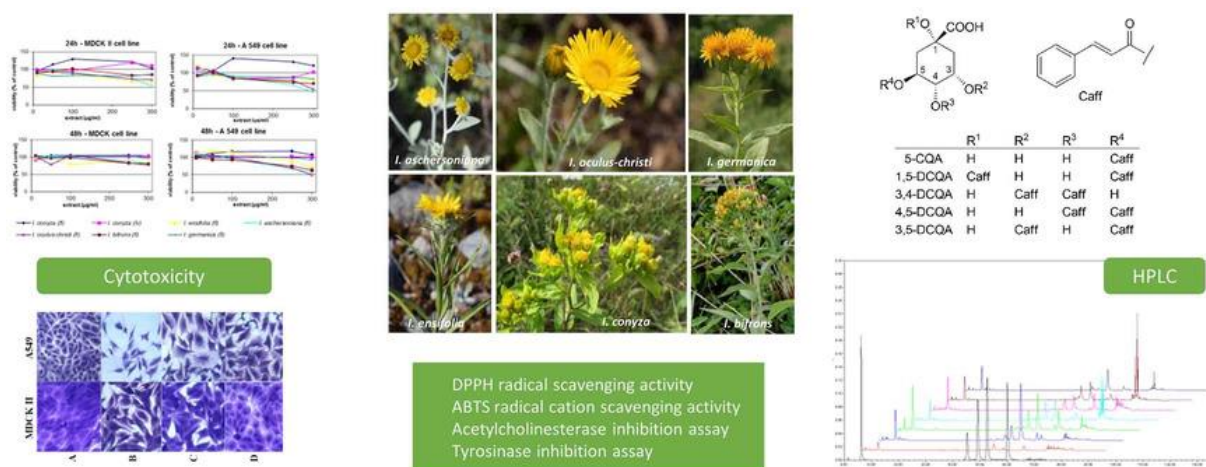
Изследвани са ефектите на фенил гликозида миконозид, извлечен от реликтното, балканско ендемично възкръсващо растение *Haberlea rhodopensis* върху структурната организация на плазмената мембрана и актиновия цитоскелет. Тъй като плазмената мембрана е първата цел на екзогенни биоактивни съединения, ние съсредоточихме

вниманието си върху влиянието на миконозида върху подреждането на липидите в мембраните и организацията на актиновия цитоскелет в човешки белодробни аденокарциномни клетки A549, използвайки флуоресцентна спектроскопия и микроскопски техники. Ние открихме, че ниската концентрация на миконозид (5 µg/ml) не променя клетъчната жизнеспособност, но е в състояние да увеличи подредеността на липидите в плазмената мембрана на третираните клетки. По-високата концентрация на миконозид (20 µg/ml) инхибира клетъчната жизнеспособност чрез намаляване на подредеността на липидите в плазмената мембрана и увреждане на актиновия цитоскелет. Ние предполагахме, че наблюдаваните промени в структурната организация на плазмената мембрана и актиновия цитоскелет са функционално свързани с жизнеспособността на клетките. Бяха използвани биомиметични мембрани, за да се докаже, че миконозидът е в състояние да реорганизира мембранните липиди чрез промяна на фракцията на домените, обогатени със сфингомиелин-холестерол. По този начин, ние предлагаме възможен механизъм на действие на миконозида върху липидите на плазмената мембрана на A549 клетки, както и върху актинови филаменти, за да обясним неговия цитотоксичен ефект при висока концентрация на миконозид.

06. Caffeoylquinic Acids, Cytotoxic, Antioxidant, Acetylcholinesterase and Tyrosinase Enzyme Inhibitory Activities of Six *Inula* Species from Bulgaria

By Antoaneta Trendafilova, Victoria Ivanova, Miroslav Rangelov, Milka Todorova, Gulmira Ozek, Suleyman Yur, Temel Ozek, Ina Aneva, Ralitzia Veleva, Veselina Moskova-Doumanova, Jordan Doumanov, Tanya Topouzova-Hristova

Chem Biodivers. 2020 Apr;17(4):e2000051. doi: 10.1002/cbdv.202000051



Abstract

Chlorogenic (5-CQA), 1,5-, 3,5-, 4,5- and 3,4-dicafeoylquinic (DCQA) acids were identified and quantified in the methanol extracts of *Inula oculus-christi* L., *I. bifrons* L., *I. aschersoniana* Janka var. *aschersoniana*, *I. ensifolia* L., *I. conyzia* (Griess.) DC. and *I. germanica* L. by HPLC

analysis. The amount of 5-CQA varied from 5.48 to 28.44 mg/g DE and the highest content was detected in *I. ensifolia*. 1,5-DCQA (4.05–55.25 mg/g DE) was the most abundant dicaffeoyl ester of quinic acid followed by 3,5-DCQA, 4,5-DCQA and 3,4-DCQA. The extract of *I. ensifolia* showed the highest total phenolic content (119.92±0.95 mg GAE/g DE) and exhibited the strongest DPPH radical scavenging activity (69.41±0.55 %). *I. bifrons* extract was found to be the most active sample against ABTS.+ (TEAC 0.257±0.012 mg/mL) and the best tyrosinase inhibitor. The studied extracts demonstrated a low inhibitory effect towards acetylcholinesterase and possessed low cytotoxicity in concentration range from 10 to 300 µg/mL toward non-cancer (MDCK II) and cancer (A 549) cells.

Резюме

Чрез HPLC анализ на метаноловите екстракти на *Inula oculus-christi* L., *I. bifrons* L., *I. aschersoniana* Janka var. *aschersoniana*, *I. ensifolia* L., *I. conyza* (Griess.) DC. и *I. germanica* L. бяха идентифицирани и количествено определени хлорогенна (5-CQA), 1,5-, 3,5-, 4,5- и 3,4-дикафеоилхинова (DCQA) киселини. Количеството на 5-CQA варира от 5,48 до 28,44 mg/g DE, като най-високото съдържание е открито в *I. ensifolia*. 1,5-DCQA (4,05–55,25 mg/g DE) е най-разпространеният дикафеолилов естер на хининова киселина, следван от 3,5-DCQA, 4,5-DCQA и 3,4-DCQA. Екстрактът от *I. ensifolia* показва най-високо общо фенолно съдържание (119,92±0,95 mg GAE/g DE) и показва най-силната DPPH радикална активност (69,41±0,55 %). Установено е, че екстрактът от *I. bifrons* е най-активната проба срещу ABTS.+ (TEAC 0,257±0,012 mg/mL) и най-добрият инхибитор на тирозиназата. Изследваните екстракти демонстрират слаб инхибиторен ефект спрямо ацетилхолинестеразата и притежават ниска цитотоксичност в диапазон на концентрация от 10 до 300 µg/mL към неракови (MDCK II) и ракови (A 549) клетки.

07. *Haberlea rhodopensis* extracts affect cell periphery of keratinocytes

By Aneliya Kostadinova, Jordan Doumanov, Daniela Moyankova, Sergei Ivanov, Kirilka Mladenova, Dimitar Djilianov, Tanya Topouzova-Hristova

Comptes rendus de l'Acad'emie bulgare des Sciences, Tome 69, No 4, 2016

Abstract

Common features of chronic dermatological conditions are inflammation and ROS over generation, as well as disturbances in cell proliferation and differentiation. Our aim was to study the impact of *Haberlea rhodopensis* extracts on the mitochondrial activity, integrity of cell membranes, actin cytoskeleton and tight junctions (the loss of ZO-1 protein) of the human keratinocytes (HaCaT cells). Cytotoxicity tests such as MTS, LDH assay and trypan blue exclusion assay were performed to evaluate metabolic activity and membrane permeability of the cells. In concentrations up to 2 mg/ml the extracts influence cell periphery, permeabilize the membrane and disrupt tight junctions of HaCat keratinocytes, which is more pronounced in actively dividing cells (–Ca⁺ cells). Our results show that extracts of *Haberlea rhodopensis*

could be a good candidate to be used in complex treatment of pathological dermatological conditions.

Резюме

Общите характеристики на хроничните дерматологични състояния са възпаление и генериране на ROS, както и нарушения в клетъчната пролиферация и диференциация. Нашата цел беше да проучим въздействието на екстрактите от *Haberlea rhodopensis* върху митохондриалната активност, целостта на клетъчните мембрани, актиновия цитоскелет и плътните контакти (загубата на ZO-1 протеин) на човешки кератиноцити (HaCaT). Тестове за цитотоксичност, като MTS, LDH анализи и тест за изключване на трипаново синьо бяха проведени за оценка на метаболитната активност и мембранната пропускливост на клетките. В концентрации до 2 mg/ml екстрактите повлияват клетъчната периферия, пермеабilizират мембраната и нарушават плътните контакти на HaCaT кератиноцитите, което е по-изразено при активно делящи се клетки. Нашите резултати показват, че екстрактите от *Haberlea rhodopensis* могат да бъдат добър кандидат за използване в комплексно лечение на патологични дерматологични състояния.

08. COMPARATIVE ANALYSIS OF MEMBRANE LIPID ORDER IMAGING WITH TWO FLUORESCENT PROBES IN INTACT CELLS

By Ralitsa Veleva, Galya Staneva, Tanya Topouzova-Hristova

Annual of Sofia University "St. Kliment Ohridski", Faculty of Biology, Book 4 - Scientific Sessions of the Faculty of Biology 2019, volume 104, pp. 42-51

Abstract:

Cell membranes include vast range of lipids which form segregated regions of structure and function. They assemble small, dynamic clusters of lipids in a more ordered state called "rafts". These microdomains mediate cellular processes such as protein sorting, signal transduction, membrane trafficking and cell adhesion. Large part of our knowledge about the behaviour of lipid mixtures in bilayers is shaped from studies on model membranes which are with well-defined composition. Our aim was to observe domains on the more complex membrane systems of intact cells.

We applied membrane probes which give information on the degree of lipid packing to make membrane domains visible. We compared two polarity sensitive fluorescent probes – namely Laurdan and di-4-ANEPPDHQ. Two cell lines with distinct differences in their plasma membrane composition and two fluorescent methods for analysis of rafts – microscopy and spectroscopy were chosen. We obtained reliable assessment of the state of the membrane order through both methods. Di-4-ANEPPDHQ provided better micrographs with the available microscope technique.

Резюме:

Клетъчните мембрани включват широка гама от липиди, които образуват отделни структурни и функционални домени. Те събират малки, динамични кълъстери от липиди в по-подредено състояние, наречени „рафтове“. Тези микродомени медираат клетъчни процеси като сортиране на белтъци, сигнална трансдукция, мембранен трафик и клетъчна адхезия. Голяма част от нашите познания за поведението на липидните смеси в двуслойни слоеве са оформени от проучвания върху моделни мембрани, които са с добре дефиниран състав. Нашата цел беше да наблюдаваме домени на по-сложните мембранни системи на непокътнати клетки.

Приложихме мембранни сонди, които дават информация за степента на подреждане на липидите, за да направят мембранните домени видими. Сравнихме две чувствителни към полярността флуоресцентни сонди – а именно Laurdan и Di-4-ANEPPDHQ. Избрани са две клетъчни линии с отчетливи разлики в състава на плазмената им мембрана и два флуоресцентни метода за анализ на рафтове – микроскопия и спектроскопия. Получихме надеждна оценка на състоянието на мембрания флуидитет и чрез двата метода. Di-4-ANEPPDHQ осигури по-добри микрографии с наличната микроскопска техника.

09. COMPARATIVE ANALYSIS OF EFFECTS OF SESQUITERPENE LACTONES AND POLYPHENOLS FROM INULA OCULUS-CHRISTI L. ON NORMAL AND CANCER CELLS

By R. Veleva, M. Borisova, M. Milev, A. Kostadinova, B. Mravkov, J. Doumanov, V. Moskova-Doumanova, A. Trendafilova, M. Todorova, T. Topouzova-Hristova

Annuaire de l'Université de Sofia "St. Kliment Ohridski", Faculte de Biologie, 2018, volume 103, livre 4, pp. 13-21

Abstract:

Plant extracts have been widely used in traditional medicine for centuries. The experimental research on some herbs from genus *Inula* indicated the anti-tumor effect of certain components of plant extracts. Our previous studies have revealed stronger anti-proliferative effect of the total extracts from *Inula oculus-christi* on cancer cells compared to non-cancer cells. Our current efforts are to identify those of the extracts' components, responsible for the observed effects. The aim of this study was to establish the effects of two extracts from on cancer and non-cancer cells. One of them was enriched in sesquiterpene lactones (extract A) and second - in phenolic acids and flavonoids (polyphenols, extract B). As a model system, we used non-cancer MDCKII cell line and cancer A549 cell line. Cytotoxicity was measured spectrophotometrically by crystal violet assay and the IC50 (inhibition concentration) for both extracts on both cell lines was determined. Changes in cell morphology were observed by bright field microscopy. Determined IC50 was higher for non-cancer cells than for cancer cells. We observed milder changes in the morphology of MDCK II cells after treatment. Our results indicate stronger impacts of studied extracts on cancer cells rather than on non-cancer cell. Extracts enriched in sesquiterpene lactones showed stronger cytotoxic effect.

Резюме:

Растителните екстракти се използват широко в традиционната медицина от векове. Експерименталните изследвания върху някои билки от род *Inula* показват противотуморния ефект на някои компоненти на растителни екстракти. Нашите предишни проучвания разкриха по-силен антипролиферативен ефект на общите екстракти от *Inula oculus-christi* върху раковите клетки в сравнение с нераковите клетки. Сегашните ни усилия са да идентифицираме тези от компонентите на екстрактите, отговорни за наблюдаваните ефекти. Целта на това изследване беше да се установят ефектите на два екстракта от върху раковите и нераковите клетки. Единият е обогатен на сесквитерпенови лактони (екстракт А), а вторият - на фенолни киселини и флавоноиди (полифеноли, екстракт Б). Като моделна система използвахме неракова клетъчна линия MDCKII и ракова клетъчна линия A549. Цитотоксичността беше измерена спектрофотометрично чрез кристално виолетово оцветяване и се определи IC50 (концентрация на инхибиране) за двата екстракта и на двете клетъчни линии. Промените в клетъчната морфология се наблюдават чрез светлинна микроскопия. Определената IC50 беше по-висок за нераковите клетки, отколкото за раковите клетки. Наблюдавахме по-леки промени в морфологията на MDCK II клетки след лечение. Нашите резултати показват по-силно въздействие на изследваните екстракти върху раковите клетки, отколкото върху нераковите клетки. Екстрактите, обогатени със сесквитерпенови лактони, показват по-силен цитотоксичен ефект.

10. CYTOTOXICITY OF FLAVONOID GLYCOSIDES, FLAVONOID AGLYCONES AND PHENOLIC ACIDS FROM INULA OCULUS-CHRISTI L. ON MAMMALIAN CELL LINES

By Ralitsa K. Veleva, Veselina S. Moskova-Doumanova, Milka N. Todorova, Antoaneta B. Trendafilova, Jordan A. Doumanov, Tanya I. Topouzova-Hristova

J. BioSci. Biotechnol. 2016, 5(3): 219-224

ABSTRACT

Herbs of the genus *Inula* are well known in traditional medicine. Their extracts are used as expectorants, antitussives, bactericides as well as for the treatment of lung inflammation and have shown to possess anti-inflammatory and secretolytic activity. Experimental research findings indicate the anti-tumor effect of certain components of extracts from *Inula cappa* and *Inula britannica* and those from *Inula racemosa* have antimicrobial and antidiabetic activity.

We have directed our efforts on investigating the effects of different extracts from *Inula oculus-christi* L., enriched with certain groups of biologically active substances - flavonoid glycosides (A), phenolic acids (B), flavonoid glycosides and phenolic acids (C), flavonoid aglycones and phenolic acids (D). The effect of these extracts on normal (MDCK II and

RPE1) and carcinoma cell lines (A549 and HepG2) was evaluated. We have performed cytotoxicity study (crystal violet assay) as well as morphological analysis of changes induced by the extracts. Among the tumor cell lines HepG2 show greater sensitivity. Surprisingly extract C has no significant influence on both cancer cell lines.

РЕЗЮМЕ

Билките от род *Inula* са добре познати в традиционната медицина. Техните екстракти се използват като отхрачващи, противокашлични, бактерицидни средства, както и за лечение на белодробни възпаления и са показали, че притежават противовъзпалително и секретолитично действие. Резултатите от експериментални изследвания показват антитуморния ефект на някои компоненти на екстракти от *Inula cappa* и *Inula britannica* и тези от *Inula racemosa* имат антимикробно и антидиабетно действие.

Насочихме усилията си към изследване на ефектите на различни екстракти от *Inula oculus-christi* L., обогатени с определени групи биологично активни вещества - флавоноидни гликозиди (А), фенолни киселини (В), флавоноидни гликозиди и фенолни киселини (С), флавоноидни агликони и фенолни киселини (D). Беше оценен ефектът на тези екстракти върху нормални (MDCK II и RPE1) и карциномни клетъчни линии (A549 и HepG2). Извършихме изследване на цитотоксичността (оцветяване с кристално виолетово), както и морфологичен анализ на промените, предизвикани от екстрактите. Сред туморните клетъчни линии HepG2 показва по-голяма чувствителност. Изненадващо, екстракт С няма значително влияние върху двете ракови клетъчни линии.

11. COMPARATIVE ANALYSIS OF CYTOTOXICITY OF CHLOROFORM EXTRACTS FROM LAMIUM ALBUM L. AND MORPHOLOGICAL ALTERATIONS IN MAMMALIAN CELLS

By Ralitsa Veleva, Veselina Moskova-Doumanova, Daniela Dragolova, Jordan Doumanov, Tanya Topouzova-Hristova

Annuaire de l'Université de Sofia "St. Kliment Ohridski", Faculte de Biologie, 2017, volume 102, livre 4, pp. 194-204

Abstract:

Lamium album L. is a plant commonly used in traditional medicine because of its anti-inflammatory, astringent, antiseptic and antispasmodic activities. There are differences in the composition of secondary metabolites in plants grown in their natural habitats (in vivo), micropropagated plants (in vitro) and after their subsequent cultivation in a natural environment (ex vitro). In this study we aim to compare the activity of chloroform Soxhlet extracts from *Lamium album* plants, collected from a wild population, cultivated in vitro and adapted ex vitro on A549 human cancer cell line and the non-cancer kidney epithelial

cells MDCKII. We have performed cell cytotoxicity test (crystal violet assay) and membrane permeability test (trypan blue exclusion assay) as well as morphological analysis of changes induced by the extracts.

Upon treatment with extract ex vitro a large percentage of cells with damaged membranes at 24 hours has been observed. After 48 hours the total number of cells has been reduced, but the cells with damaged membranes have a relatively small rate. For comparison, 48 hours after treatment with in vitro extract, 100% damaged A549 cells has been observed.

Резюме:

Lamium album L. е растение, което обикновено се използва в традиционната медицина поради неговите противовъзпалителни, съдосвиващи, антисептични и спазмолитични действия. Съществуват разлики в състава на вторичните метаболити в растения, отглеждани в техните естествени местообитания (in vivo), микроразмножени растения (in vitro) и след последващото им култивиране в естествена среда (ex vitro). В това проучване ние целим да сравним активността на хлороформени Soxhlet екстракти от растения *Lamium album*, събрани от дива популация, култивирани in vitro и адаптирани ex vitro върху A549 човешка ракова клетъчна линия и неракови бъбречни епителни клетки MDCKII. Извършихме тест за цитотоксичност (тест с кристално виолетово) и тест за пропускливост на мембраната (тест за изключване на трипаново синьо), както и морфологичен анализ на промените, предизвикани от екстрактите.

При третиране с екстракт ex vitro се наблюдава голям процент клетки с увредени мембрани след 24 часа. След 48 часа общият брой клетки е намален, но клетките с увредени мембрани имат относително малък процент. За сравнение, 48 часа след третиране с in vitro екстракт са наблюдавани 100% увредени A549 клетки.

12. COMPARATIVE ANALYSIS OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM CULTIVATED AND WILD PLANTS LAMIUM ALBUM L.

By R. Veleva, V. Moskova-Doumanova, J. Doumanov, V. Kapchina-Toteva, T. Topouzova-Hristova

Science & Technologies, Volume IV, Number 1, 2014, p. 122-126

ABSTRACT

Lamium album L. (white dead nettle) is a plant widely used both in traditional and in folk medicine. In the scientific literature there is evidence of its broad-spectrum activity as astringent and anti-inflammatory agent, as well as a bacteriostatic and antispasmodic. This remarkable therapeutic effect was due to the wide variety of biologically active secondary metabolites of the plant. Mass collection of plants for commercial and medical purposes would jeopardize its natural populations. This requires comparison of the biological activity of extracts of plants cultured in vitro with those collected from natural deposits.

In our previous studies we have demonstrated the potential antitumor activity of extracts of *Lamium album* L. On cell cultures. In this study, our attention was focused on the effect of extract from plants grown under different conditions on the cellular genome, the mitochondrial activity or the adhesion of normal and carcinoma cells. Our results indicate that, despite the poorer secondary metabolite composition, in vitro cultivated plants showed better antitumor activity.

РЕЗЮМЕ

Lamium album L. (бяла мъртва коприва) е растение с широко приложение както в традиционната, така и в народната медицина. В научната литература има данни за неговото широкоспектърно действие като адстрингентно и противовъзпалително средство, както и като бактериостатично и антиспазмотично средство. Този забележителен терапевтичен ефект се дължи на голямото разнообразие от биологично активни вторични метаболити на растението. Масовото събиране на растения за търговски и медицински цели би застрашило естествените му популации. Това налага сравнение на биологичната активност на екстракти от растения, култивирани in vitro с тези, събрани от естествени находища.

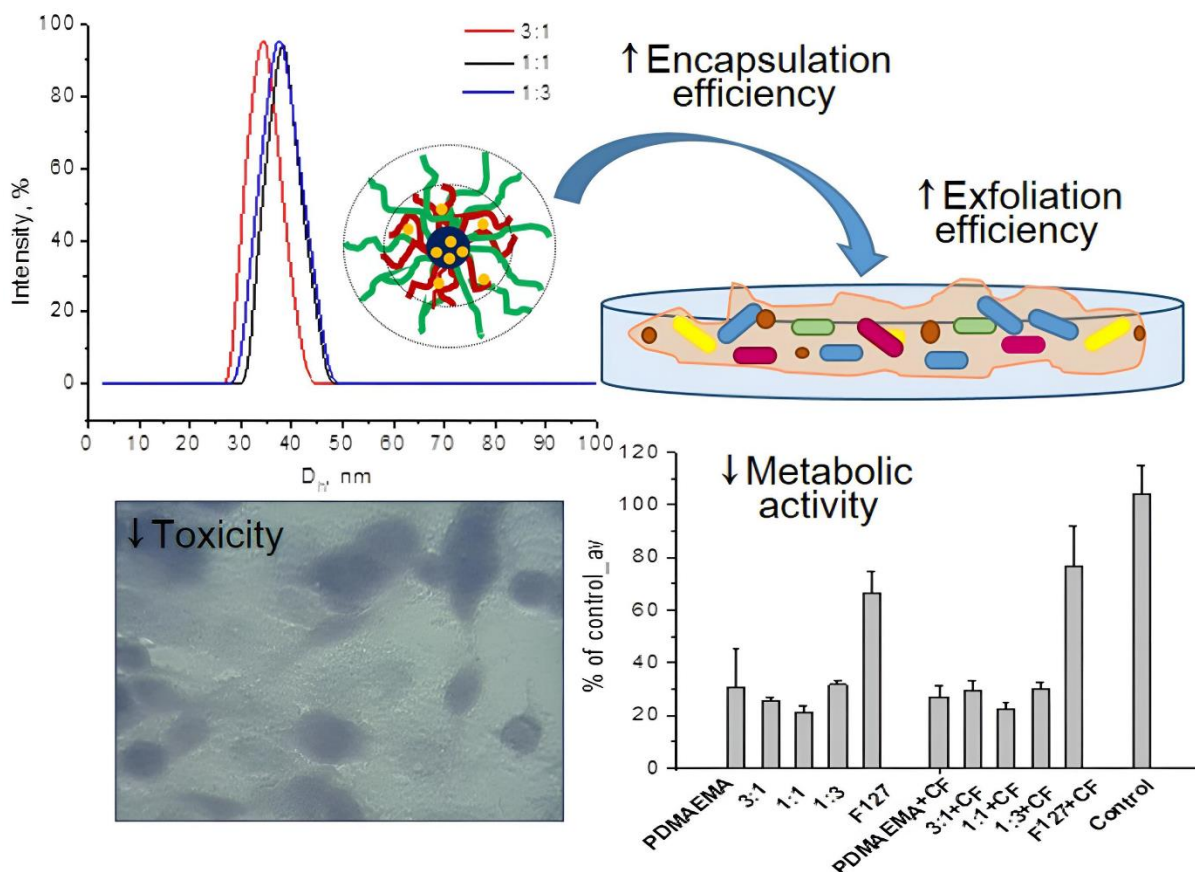
В нашите предишни проучвания ние демонстрирахме потенциалната антитуморна активност на екстракти от *Lamium album* L. върху клетъчни култури. В това изследване вниманието ни беше фокусирано върху ефекта на екстракт от растения, отглеждани при различни условия, върху клетъчния геном, митохондриалната активност или адхезията на нормални и карциномни клетки. Нашите резултати показват, че въпреки по-бедния състав на вторични метаболити, in vitro култивираните растения показват по-добра антитуморна активност.

Публикации от група Г

13. Ciprofloxacin-Loaded Mixed Polymeric Micelles as Antibiofilm Agents

By Rumena Stancheva, Tsvetelina Paunova-Krasteva, Tanya Topouzova-Hristova, Stoyanka Stoitsova, Petar Petrov and Emi Haladjova

Pharmaceutics **2023**, *15*(4), 1147; <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041147>



Abstract

In this work, mixed polymeric micelles (MPMs) based on a cationic poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)-b-poly(ϵ -caprolactone)-b-poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) (PDMAEMA29-b-PCL70-b-PDMAEMA29) and a non-ionic poly(ethylene oxide)-b-poly(propylene oxide)-b-poly(ethylene oxide) (PEO99-b-PPO67-b-PEO99) triblock copolymers, blended at different molar ratios, were developed. The key physicochemical parameters of MPMs, including size, size distribution, and critical micellar concentration (CMC), were evaluated. The resulting MPMs are nanoscopic with a hydrodynamic diameter of around 35 nm, and the ζ -potential and CMC values strongly depend on the MPM's composition. Ciprofloxacin (CF) was solubilized by the micelles via hydrophobic interaction with the micellar core and electrostatic interaction between the polycationic blocks, and the drug localized it, to some extent, in the micellar corona. The effect of a polymer-to-drug mass ratio on the drug-loading content (DLC) and encapsulation efficiency (EE) of MPMs was assessed. MPMs prepared at a polymer-to-drug mass ratio of 10:1 exhibited very high EE and a prolonged release profile. All micellar systems demonstrated their capability to detach pre-formed Gram-positive and Gram-negative bacterial biofilms and significantly reduced their biomass. The metabolic activity of the biofilm was strongly suppressed by the CF-loaded MPMs indicating the successful drug delivery and release. The cytotoxicity of empty and CF-loaded MPMs was evaluated. The test reveals composition-dependent cell viability without cell destruction or morphological signs of cell death.

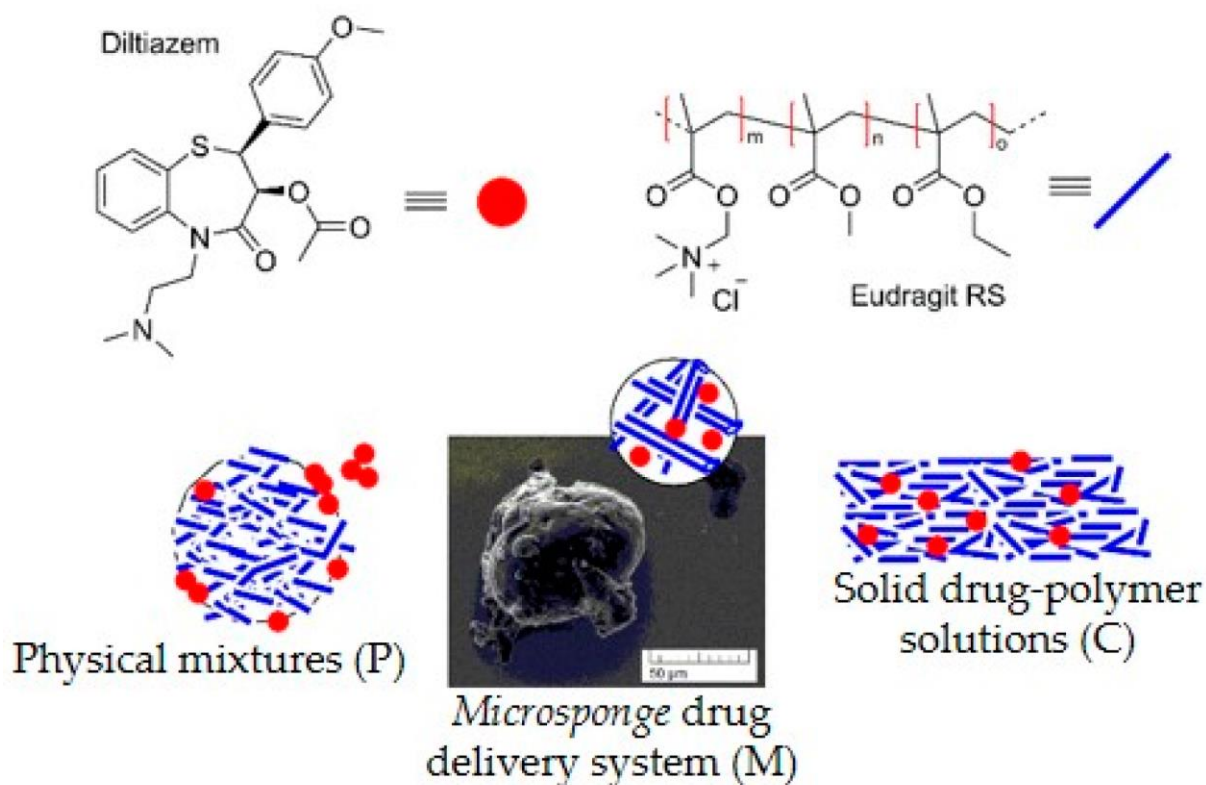
Резюме

В това изследване бяха разработени смесени полимерни мицели (МРМ) на базата на катионен поли(2-(диметиламино)етилметакрилат)-b-поли(ϵ -капролактон)-b-поли(2-(диметиламино)етилметакрилат) (PDMAEMA29-b-PCL70-b-PDMAEMA29) и нейонни поли(етилен оксид)-b-поли(пропилен оксид)-b-поли(етилен оксид) (PEO99-b-PPO67-b-PEO99) триблокови съполимери, смесени при различни моларни съотношения. Бяха оценени ключовите физикохимични параметри на МРМ, включително размер, разпределение на размера и критична мицеларна концентрация (СМС). Получените МРМ са наноразмерни с хидродинамичен диаметър от около 35 nm, а стойностите на ζ -потенциала и СМС силно зависят от състава на МРМ. Мицелите бяха натоварени с разтвор на ципрофлоксацин (CF) чрез хидрофобно взаимодействие с мицеларното ядро и електростатично взаимодействие между поликатионните блокове, като лекарството се локализира до известна степен в мицеларната корона. Беше оценен ефектът от масовото съотношение полимер към лекарство върху съдържанието на лекарствено натоварване (DLC) и ефективността на капсулиране (EE) на МРМ. МРМ, приготвени при масово съотношение полимер към лекарство 10:1, показват много високо EE и профил на удължено освобождаване. Всички мицеларни системи демонстрираха способността си да разрушат предварително образуваните Грам-положителни и Грам-отрицателни бактериални биофилми и значително намалиха тяхната биомаса. Метаболитната активност на биофилма беше силно потисната от натоварените с CF МРМ, което показва успешното доставяне и освобождаване на лекарството. Беше оценена и цитотоксичността на празни и натоварени с CF МРМ върху човешки клетки. Тестът разкрива зависима от състава клетъчна жизнеспособност без разрушаване на клетките или морфологични признаци на клетъчна смърт.

14. Ammonio Methacrylate Copolymer (Type B)-Diltiazem Interactions in Solid Dispersions and Microsponge Drug-Delivery Systems

By Iliyan Kolev, Nadezhda Ivanova, Tanya Topouzova-Hristova, Tanya Dimova, Pavlina Koseva, Ivalina Vasileva, Sonya Ivanova, Anton Apostolov, Gergana Alexieva, Atanas Tzonev and Vesselin Strashilov

Polymers 2022, 14, 2125. <https://doi.org/10.3390/polym14102125>



Abstract:

This paper presents a complex analytical study on the distribution, solubility, amorphization, and compatibility of diltiazem within the composition of Eudragit RS 100-based particles of microspongeous type. For this purpose, a methodology combining attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) absorption spectroscopy, differential scanning calorimetry (DSC), scanning electron microscopy with energy-dispersive X-ray microanalysis (SEM-EDX), and in vitro dissolution study is proposed. The correct interpretation of the FTIR and drug-dissolution results was guaranteed by the implementation of two contrasting reference models: physical drug-polymer mixtures and casting-obtained, molecularly dispersed drug-polymer composites (solid dispersions). The spectral behavior of the drug-polymer composites in the carbonyl frequency (CO) region was used as a quality marker for the degree of their interaction/mutual solubility. A spectral-pattern similarity between the microsponge particles and the solid dispersions indicated the molecular-type dispersion of the former. The comparative drug-desorption study and the qualitative observations over the DSC and SEM-EDX results confirmed the successful synthesis of a homogeneous coamorphous microsponge-type formulation with excellent drug-loading capacity and “controlled” dissolution profile. Among them, the drug-delivery particles with 25% diltiazem content (M-25) were recognized as the most promising, with the highest population of drug molecules in the polymer bulk and the most suitable desorption profile. Furthermore, an economical and effective analytical algorithm was developed for the comprehensive physicochemical characterization of complex delivery systems of this kind.

Резюме:

Тази статия представя комплексно аналитично изследване на разпределението, разтворимостта, аморфизацията и съвместимостта на дилтиазем в състава на базирани на Eudragit RS 100 частици от микрогъбест тип. За тази цел е използвана методология, съчетаваща абсорбционна спектроскопия с атенюирана пълна инфрачервена трансформация на Фурие (ATR-FTIR), диференциална сканираща калориметрия (DSC), сканираща електронна микроскопия с енергийно-дисперсивен рентгенов микроанализ (SEM-EDX) и *in vitro* изследване на разтварянето. Правилното тълкуване на резултатите от FTIR и разтварянето на лекарството беше гарантирано от прилагането на два контрастиращи референтни модела: физически смеси лекарство-полимер и получени чрез отливане, молекулярно диспергирани композити лекарство-полимер (твърди дисперсии). Спектралното поведение на композитите лекарство-полимер в областта на карбонилната честота (CO) се използва като качествен маркер за степента на тяхното взаимодействие/взаимна разтворимост. Сходство на спектрален модел между частиците на микрогъбата и твърдите дисперсии показва дисперсията от молекулен тип на първите. Сравнителното изследване за десорбция на лекарството и качествените наблюдения върху резултатите от DSC и SEM-EDX потвърдиха успешния синтез на хомогенна коаморфна формула от микрогъбен тип с отличен капацитет за зареждане с лекарство и „контролиран“ профил на разтваряне. Сред тях частиците за доставяне на лекарства с 25% съдържание на дилтиазем (M-25) бяха признати за най-обещаващи, с най-високата популация от лекарствени молекули в обема на полимера и най-подходящия профил на десорбция. Освен това беше разработен икономичен и ефективен аналитичен алгоритъм за цялостна физикохимична характеристика на комплексни системи за доставяне от този вид.

15. Destruction of *Pseudomonas aeruginosa* preformed biofilms by cationic polymer micelles bearing silver nanoparticles

Tsvetelina Paunova-Krasteva , Emi Haladjova , Petar Petrov , Aleksander Forys , Barbara Trzebicka, Tanya Topouzova-Hristova & Stoyanka R. Stoitsova

Biofouling, DOI: 10.1080/08927014.2020.1799354

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic Gram-negative pathogen often associated with biofilm infections. This study evaluated the capacity for biofilm destruction of a novel combination of cationic polymer micelles formed from poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)-b-poly(ε-caprolactone)-b-poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) (PDMAEMA-PCL-PDMAEMA) triblock copolymer either alone, or loaded with silver nanoparticles (M_AgNPs). Pre-formed *P. aeruginosa* biofilms were incubated with either blank micelles, AgNO₃, or M_AgNPs. Biofilm biomass (crystal violet assay), metabolic

activity (Alamar blue reduction), structure (SEM) and viability (CLSM after Live/Dead staining, or plating for CFU) were checked. The results showed that the micelles alone loosened the biofilm matrix, and caused some alterations in the bacterial surface. AgNO₃ killed the bacteria in situ leaving dead biofilm bacteria on the surface. M_AgNPs combined the two types of activities causing significant biofilm reduction, and alteration and death of biofilm bacteria. Therefore, the applied PDMAEMA-based micelles appear to be a successful candidate for the treatment of *P. aeruginosa* biofilm infections.

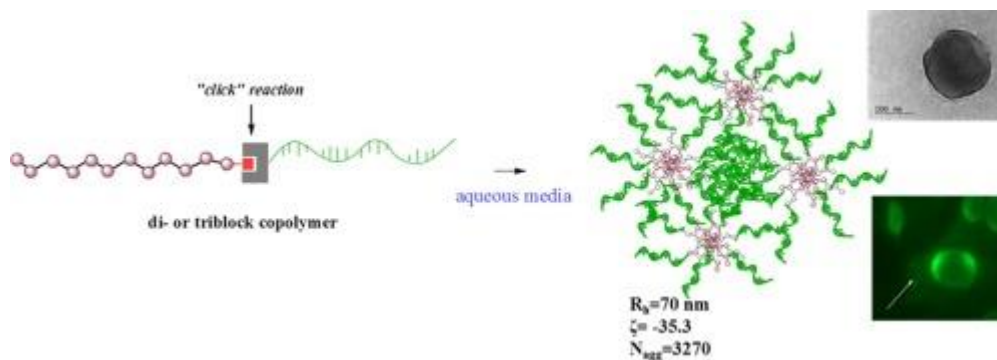
Резюме

Pseudomonas aeruginosa е опортюнистичен грам-отрицателен патоген, често свързан с биофилмне инфекции. Това проучване оценява капацитета за разрушаване на биофилм на нова комбинация от катионни полимерни мицели, образувани от поли(2-(диметиламино)етилметакрилат)-b-поли(ε-капролактон)-b-поли(2-(диметиламино)етилметакрилат) (PDMAEMA-PCL-PDMAEMA) триблок съполимер самостоятелно или зареден със сребърни наночастици (M_AgNP). Предварително формираните биофилми на *P. aeruginosa* се инкубират с празни мицели, AgNO₃ или M_AgNPs. Бяха проверени биомаса на биофилм (тест с кристално виолетово), метаболитна активност (редукция на Alamar blue), структура (SEM) и жизнеспособност (CLSM след оцветяване Live/Dead или посяване за CFU). Резултатите показват, че самите мицели разхлабват матрикса на биофилма и причиняват някои промени в бактериалната повърхност. AgNO₃ убива бактериите in situ, оставяйки мъртви бактерии от биофилма на повърхността. M_AgNP комбинират двата вида дейности, причинявайки значително намаляване на биофилма и повлияване или смърт на бактериите от биофилм. Следователно, приложените мицели на базата на PDMAEMA изглеждат успешен кандидат за лечение на биофилмни инфекции с *P. aeruginosa*.

16. Assembly of amphiphilic nucleic acid-polymer conjugates into complex superaggregates: Preparation, properties, and in vitro performance

By Pavel Bakardzhiev, Natalia Toncheva-Moncheva, Kirilka Mladenova, Svetla Petrova, Pavel Videv, Veselina Moskova-Doumanova, Tanya Topouzova-Hristova, Jordan Doumanov, Stanislav Rangelov

European Polymer Journal Volume 131, 15 May 2020, 109692;
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109692>



Abstract:

Nucleic acid-polymer conjugates (NAPCs) are obtained by click coupling reactions of appropriately functionalized oligonucleotides with synthetic polymer chains of different chemical nature, composition, and properties, namely, polyethers such as poly(ethoxyethyl glycidyl ether) and polyesters such as poly(ϵ -caprolactone). The resulting NAPCs are amphiphilic and form stable aggregates in aqueous solution. The aggregates are thoroughly investigated by a variety of techniques – static, dynamic, and electrophoretic light scattering, transmission electron microscopy, and atomic force microscopy. The size and molar masses of the particles as well as other parameters such as aggregation number and number of oligonucleotide strands per particle are significantly larger than those, reported for metal-free spherical nucleic acids. Formation of superaggregates of smaller individual micelles or non-micellar assemblies by hydrophobic interactions between the synthetic polymer chains and “sticky” interactions between oligonucleotides such as base pairing, π -stacking, hydrogen bonding is anticipated. The “sticky” interactions are counterbalanced by repulsion between the negatively charged oligonucleotide strands thus providing colloidal stability of the structures. The surface density of the oligonucleotide strands in the shell implies that the latter are in a random coil (mushroom) conformation rather than in a fully extended, brush regime. The hallmark properties of the prototypical spherical nucleic acids – non-toxicity and biocompatibility, increased cellular uptake without the need of transfection agents, enhanced nuclease stability – are also exhibited by the novel constructs despite of the differences in size, morphology, and structure.

Резюме:

Конюгатите от нуклеинови киселини и полимер (NAPCs) се получават чрез клик-реакции на свързване на подходящо функционализирани олигонуклеотиди със синтетични полимерни вериги с различно химично естество, състав и свойства, а именно полиетери като поли(етоксиетил глицидил етер) и полиестери като поли(ϵ -капролактон). Получените NAPC са амфибилни и образуват стабилни агрегати във воден разтвор. Агрегатите са изследвани задълбочено чрез различни техники – статично, динамично и електрофоретично разсейване на светлината, трансмисионна електронна микроскопия и атомно-силово микроскопия. Размерът и моларните маси

на частиците, както и други параметри като брой агрегати и брой олигонуклеотидни нишки на частица са значително по-големи от тези, докладвани за безметални сферични нуклеинови киселини. При този тип структури се очаква образуването на суперагрегати от по-малки индивидуални мицели или немицеларни групи чрез хидрофобни взаимодействия между синтетичните полимерни вериги и „лепкави“ взаимодействия между олигонуклеотиди, като сдвояване на бази, π -подреждане, водородни връзки. „Лепкавите“ взаимодействия се уравновесяват от отблъскване между отрицателно заредените олигонуклеотидни вериги, като по този начин осигуряват колоидна стабилност на структурите. Повърхностната плътност на олигонуклеотидните вериги в обвивката предполага, че последните са в конформация на произволна намотка (гъба), а не напълно удължени, в четковидна структура. Характерните свойства на прототипните сферични нуклеинови киселини – нетоксичност и биосъвместимост, повишено клетъчно усвояване без необходимост от трансфекционни агенти, повишена устойчивост към нуклеази – бяха установени и от новите конструкции въпреки разликите в размера, морфологията и структурата.

17. Polymeric vehicles for transport and delivery of DNA via cationic micelle template method

By Emi Haladjova, Mariya Kyulavska, Jordan Doumanov, Tanya Topouzova-Hristova & Petar Petrov

Colloid Polym Sci (2017) 295:2197-2205 DOI 10.1007/s00396-017-4193-7

Abstract:

This work describes the preparation of polymeric non-viral system for transport and delivery of nucleic acids. An amphiphilic poly (2- (dimethylamino) ethyl methacrylate)-block - poly (ϵ -caprolactone) - block - poly (2- (dimethylamino) ethyl methacrylate) (PDMAEMA20-b-PCL70-b-PDMAEMA20) triblock copolymer was synthesized and used for formation of cationic micelles and subsequent complexation with DNA. Next, a protective polymer coating on the complex surface and removal of copolymer from the particle interior were conducted. In this way, polymer nanocapsules containing DNA molecules were obtained. The synthesized polymer, cationic micelles, complexes, and polymer capsules were investigated by proton nuclear magnetic resonance, gel permeation chromatography, dynamic and electrophoretic light scattering, and transmission electron microscopy. In vitro cytotoxicity assessment of the different systems revealed very good tolerance to human cells.

Резюме:

Тази работа описва получаването на полимерна невирусна система за транспорт и доставка на нуклеинови киселини. Амфифилен поли (2-(диметиламино) етил метакрилат)- блок - поли (ϵ -капролактон) - блок - поли (2-(диметиламино) етил метакрилат) (PDMAEMA20-b-PCL70-b-PDMAEMA20) триблок съполимер беше

синтезиран и използван за образуване на катионни мицели и последващо комплексобразуване с ДНК. След това се направи защитно полимерно покритие върху сложната повърхност и отстраняване на съполимера от вътрешността на частиците. По този начин бяха получени полимерни нанокапсули, съдържащи ДНК молекули. Синтезираният полимер, катионни мицели, комплекси и полимерни капсули бяха изследвани чрез протонен ядрено-магнитен резонанс, Молекулно-ситова (гелпроникваща) хроматография, динамично и електрофоретично разсейване на светлината и трансмисионна електронна микроскопия. *In vitro* оценката на цитотоксичността на различните системи разкрива много добра поносимост на човешки клетки към създадените нанокапсули.

18. Effect of electrical field and miltefosine on actin and actin-associated protein ZO-1 organization in cancer and non cancerous cells

By Aneliya Kostadinova, Irina Georgieva, Tanya Topouzova-Hristova, Rumiana Tzoneva

Comptes rendus de l'Acad'emie bulgare des Sciences, Tome 69, No 5, 2016

Abstract

The actin cytoskeleton plays a key role in the stability of cell-cell junctions, adhesion and cell motility, which are crucial for tumour progression and metastases. Changes in the actin filaments organization could affect and increase permeability of cell monolayer due to interruption and reorganization of tight junctions in epithelial cells.

In this study we investigate the combined effect of the electroporation and miltefosine on the F-actin and ZO-1 in cancer epithelial line A549 and non-cancer cell line MDCKII. Our results showed that treatment of A549 and MDCK cells with electrical field in combination with miltefosine is cell-specific. The cancer A549 cell line was found to be more sensitive to the treatment as compared to non-cancerous cells. Actin cytoskeleton was highly disturbed while ZO-1 organization seems stabilized.

Резюме:

Актиновият цитоскелет играе ключова роля в стабилността на междуклетъчните контакти, адхезията и клетъчната подвижност, които са от решаващо значение за прогресията на туморите и метастазите. Промените в организацията на актиновите микрофиламенти могат да повлияят и да увеличат пропускливостта на клетъчния монослой поради прекъсване и реорганизация на плътните контакти в епителните клетки.

В това проучване ние изследваме комбинирания ефект на електропорацията и милтефозина върху F-актина и ZO-1 в раковата епителна линия A549 и неракова клетъчна линия MDCKII. Нашите резултати показват, че третирането на A549 и MDCK клетки с електрически импулс в комбинация с милтефозин има клетъчно-специфичен ефект. Установихме, че раковата клетъчна линия A549 беше по-

чувствителна към третирането в сравнение с нераковите клетки. Актиновият цитоскелет беше силно нарушен, докато организацията на ZO-1 изглежда стабилизирана.

19. Preparation and Biological Activity of New Collagen Composites, Part I: Collagen/Zinc Titanate Nanocomposites

By Madalina G. Albu, Todorka G. Vladkova, Iliana A. Ivanova, Ahmed S. A. Shalaby, Veselina S. Moskova-Doumanova, Anna D. Staneva, Yanko B. Dimitriev, Anelya S. Kostadinova, Tanya I. Topouzova-Hristova

Appl Biochem Biotechnol, DOI 10.1007/s12010-016-2092-x

Abstract:

The aim of this investigation was to develop new antimicrobial collagen/zinc titanate (ZnTiO_3) biomaterials using a sol–gel cryogenic drying technology in keeping the native collagen activity. Broad-spectrum antimicrobial activity was demonstrated against Firmicutes (*Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, and *Candida lusitanae*) and Gracilicutes (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, and *Pseudomonas putida*) microorganisms. The antimicrobial activity as well as the cytotoxicity were specific for the different test microorganisms (Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi) and model eukaryotic cells (osteosarcoma, fibroblast, and keratinocyte cells), respectively, and both were depending on the ZnTiO_3 concentration. Three mechanisms of the antimicrobial action were supposed, including (i) mechanical demolition of the cell wall and membrane by the crystal nanoparticles of the ZnTiO_3 entrapped in the collagen matrix, (ii) chelation of its metal ions, and (iii) formation of free oxygen radicals due to the interaction between the microbial cells and antimicrobial agent. It was concluded that the optimal balance between antimicrobial activity and cytotoxicity could be achieved by a variation of the ZnTiO_3 concentration. The antifungal and broad-spectrum antibacterial activity of the studied collagen/ ZnTiO_3 nanocomposites, combined with a low cytotoxicity, makes them a promising anti-infection biomaterial.

Резюме:

Целта на това изследване беше да се разработи нов антимикробен биоматериал коллаген/цинк титанатни (ZnTiO_3), използващи зол-гел криогенна технология за изсушаване за поддържане на нативна коллагенова активност. Доказахме широкоспектърна антимикробна активност срещу Фирмикутни (*Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus* и *Candida lusitanae*) и Грациликутни микроорганизми (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica* и *Pseudomonas putida*). Антимикробната активност, както и цитотоксичността са специфични съответно за различните тестови микроорганизми (грам-положителни и грам-отрицателни бактерии и гъбички) и моделни еукариотни клетки (остеосаркома, фибробластни и кератиноцитни клетки),

като и двете зависят от ZnTiO₃ концентрация. Вероятни са три механизма на антимикробното действие, включително (i) механично разрушаване на клетъчната стена и мембрана от кристалните наночастици на ZnTiO₃, уловени в колагеновата матрица, (ii) хелатиране на неговите метални йони и (iii) образуване на свободни кислородни радикали, дължащи се на взаимодействието между микробните клетки и антимикробния агент. В заключение, оптималният баланс между антимикробната активност и цитотоксичността може да бъде постигнат чрез промяна на концентрацията на ZnTiO₃. Противогъбичната и широкоспектърна антибактериална активност на изследваните нанокomпозити колаген/ZnTiO₃, съчетана с ниска цитотоксичност, ги прави обещаващ антиинфекциозен биоматериал.

20. Antitumor Lipids—Structure, Functions, and Medical Applications

By Aneliya Kostadinova, Tanya Topouzova-Hristova, Albena Momchilova, Rumiana Tzoneva, Martin R. Berger

Advances in Protein Chemistry and Structural Biology # 2015 Elsevier Inc. ISSN 1876-1623 <http://dx.doi.org/10.1016/bs.apcsb.2015.08.001>

Abstract:

Cell proliferation and metastasis are considered hallmarks of tumor progression. Therefore, efforts have been made to develop novel anticancer drugs that inhibit both the proliferation and the motility of tumor cells. Synthetic antitumor lipids (ATLs), which are chemically divided into two main classes, comprise (i) alkylphospholipids (APLs) and (ii) alkylphosphocholines (APCs). They represent a new entity of drugs with distinct antiproliferative properties in tumor cells. These compounds do not interfere with the DNA or mitotic spindle apparatus of the cell, instead, they incorporate into cell membranes, where they accumulate and interfere with lipid metabolism and lipiddependent signaling pathways. Recently, it has been shown that the most commonly studied APLs inhibit proliferation by inducing apoptosis in malignant cells while leaving normal cells unaffected and are potent sensitizers of conventional chemo- and radiotherapy, as well as of electrical field therapy. APLs resist catabolic degradation to a large extent, therefore accumulate in the cell and interfere with lipid-dependent survival signaling pathways, notably PI3K-Akt and Raf-Erk1/2, and de novo phospholipid biosynthesis. They are internalized in the cell membrane via raft domains and cause downstream reactions as inhibition of cell growth and migration, cell cycle arrest, actin stress fibers collapse, and apoptosis. This review summarizes the in vitro, in vivo, and clinical trials of most common ATLs and their mode of action at molecular and biochemical levels

Резюме:

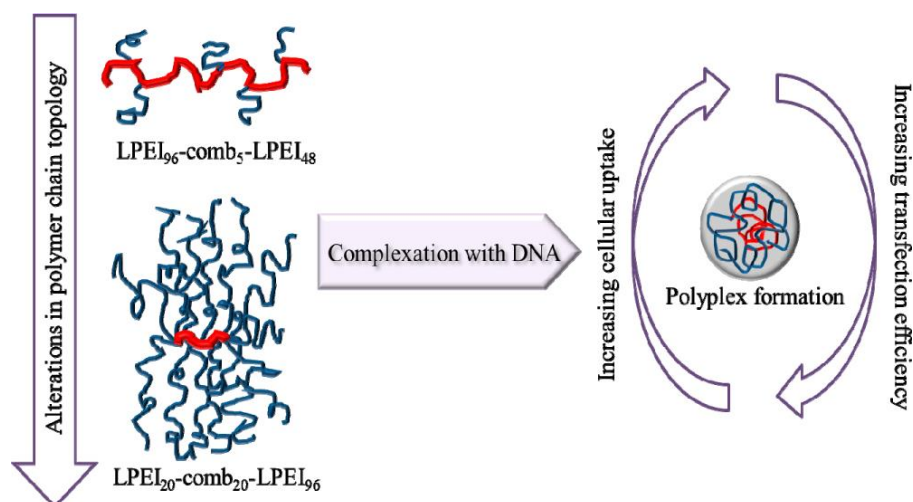
Клетъчната пролиферация и метастазите се считат за отличителни белези на туморната прогресията. Поради това са положени усилия за разработване на нови

противоракови лекарства, които инхибират както пролиферацията, така и подвижността на туморните клетки. Синтетичните антитуморни липиди (ATL), които са химически разделени на два основни класа, включват (i) алкилфосфолипиди (APL) и (ii) алкилфосфохолини (APC). Те представляват нова група от лекарства с различни антипролиферативни свойства в туморните клетки. Тези съединения не взаимодействат с ДНК или митотичното делително вретено на клетката, вместо това те се включват в клетъчните мембрани, където се натрупват и повлияват липидния метаболизъм и липидозависимите сигнални пътища. Наскоро беше показано, че най-често изследваните APL инхибират пролиферацията чрез индуциране на апоптоза в злокачествени клетки, като оставят нормалните клетки незасегнати и са мощни сенсибилизатори на конвенционалната химио- и лъчетерапия, както и на терапията с електрическо поле. APLs до голяма степен са устойчиви на катаболитно разграждане, следователно се натрупват в клетката и повлияват липид-зависимите сигнални пътища за оцеляване, по-специално PI3K-Akt и Raf-Erk1/2, и *de novo* фосфолипидна биосинтеза. Те се интернализират в клетъчната мембрана чрез *raft* домени и причиняват реакции надолу по веригата като инхибиране на клетъчния растеж и миграция, спиране на клетъчния цикъл, колапс на актиновите стрес-фибри и апоптоза. Този преглед обобщава *in vitro*, *in vivo* и клиничните изпитвания на най-често срещаните ATLs и техния начин на действие на молекулярно и биохимично ниво

21. Comblike Polyethylenimine-Based Polyplexes: Balancing Toxicity, Cell Internalization, and Transfection Efficiency via Polymer Chain Topology

By E. Haladjova, S. Halacheva, V. Posheva, E. Peycheva, V. Moskova-Doumanova, T. Topouzova-Hristova, J. Doumanov, and S. Rangelov

Langmuir 2015, 31, 10017–10025 DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b02408



ABSTRACT:

Comblike polyethylenimines with varying degrees of polymerization of both the main and side chains as well as different grafting densities were evaluated as gene delivery vectors. They were able to condense linear and plasmid DNA into nanosized polyplex particles with dimensions and surface potentials in the 130–330 nm and –30 to +15 mV ranges, respectively, depending on the amine/ phosphate (N/P) ratio. The polyplexes remained stable in aqueous and buffer solutions from several hours up to several days. The moderate colloidal stability was also manifested in a relatively broad size distribution (PDI typically above 0.2) and structural polymorphism observed by transmission electron microscopy. Both the neat polymers and polyplexes displayed low cytotoxicity in WISH cells as the relative cell viability was more than 60%. Experiments with lysosomal fluorescence staining revealed that the internalization pathways and, in turn, transfection efficiency of the polyplex nanoparticles depended on the polymer chain topology. The vector systems based on the polymers of denser structure can be considered to be promising systems for gene transfection in eukaryotic cells.

РЕЗЮМЕ:

Гребеноподобни полиетиленимини с различни степени на полимеризация както на главната, така и на страничните вериги, както и различни плътности на прикачане бяха оценени като вектори за доставка на генетичен материал. Те успешно кондензират линейна и плазмидна ДНК в наноразмерни полиплексни частици с размери и повърхностни потенциали съответно в диапазона 130-330 nm и -30 до +15 mV, в зависимост от съотношението амин/фосфат (N/P). Полиплексите остават стабилни във водни и буферни разтвори от няколко часа до няколко дни. Умерената колоидна стабилност също се проявява в относително широко разпределение на размера (PDI обикновено над 0,2) и структурен полиморфизъм, наблюдаван чрез трансмисионна електронна микроскопия. Както чистите полимери, така и полиплексите показват ниска цитотоксичност в WISH клетки, тъй като относителната клетъчна жизнеспособност е повече от 60%. Експериментите с лизозомно флуоресцентно оцветяване разкриха, че пътищата на интернализация и, от друга страна, ефективността на трансфекцията на полиплексните наночастици зависят от топологията на полимерната верига. Векторните системи, базирани на полимери с поплътна структура, могат да се считат за обещаващи системи за генна трансфекция в еукариотни клетки.

22. Effects of vipoxin and its components on HepG2 cells

By Jordan Doumanov, Kirilka Mladenova, Tanya Topouzova-Hristova, Stoyanka Stoitsova, Svetla Petrova

Toxicol 94 (2015) 36e44 <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicol.2014.12.009>

Abstract

Snake venom Phospholipases A2 (svPLA2) are among the main toxic venom components with a great impact on different tissues and organs based on their catalytic specificity and a variety of pharmacological effects, whose mechanism is still under debate.

The main toxic component, isolated from the venom of *Vipera ammodytes meridionalis*, is the heterodimeric postsynaptic ionic complex vipoxin, composed of a basic and toxic PLA2 enzyme subunit (GIIA secreted PLA2) and an acidic, enzymatically inactive and nontoxic subunit vipoxin acidic component (VAC).

This study demonstrates for the first time that vipoxin and its individual subunits affect integrity and viability of HepG2 cells displaying differences in their pharmacological activities. Under the experimental conditions, the individual PLA2 subunit induces cytotoxicity, cytoskeletal rearrangements and triggers early apoptosis in a concentration-dependent manner related to its enzymatic activity. Vipoxin and VAC do not affect cell viability but manifest high degree of genotoxicity, whereas DNA damage induced by PLA2 subunit could be defined as moderate and not associated with its catalytic activity. Our results suggest that the interactions between vipoxin subunits play an important role in HepG2 cell response and most likely affect the observed distinction between cyto- and genotoxicity.

Резюме:

Фосфолипазите А2 от змийска отрова (svPLA2) са сред основните токсични компоненти на отровата с голямо въздействие върху различни тъкани и органи въз основа на тяхната каталитична специфичност и разнообразие от фармакологични ефекти, чийто механизъм все още се обсъжда.

Основният токсичен компонент, изолиран от отровата на *Vipera ammodytes meridionalis*, е хетеродимерният постсинаптичен йонен комплекс випоксин, съставен от основна и токсична PLA2 ензимна субединица (GIIA секретиран PLA2) и киселинна, ензимно неактивна и нетоксична субединица, киселинен компонент на випоксин (VAC).

Това проучване демонстрира за първи път, че випоксинът и неговите индивидуални субединици влияят върху целостта и жизнеспособността на клетките HepG2, показващи разлики в техните фармакологични активности. При експерименталните условия индивидуалната PLA2 субединица индуцира цитотоксичност, цитоскелетни пренареждания и задейства ранна апоптоза по начин, зависим от концентрацията, свързан с нейната ензимна активност. Vipoxin и VAC не влияят на клетъчната жизнеспособност, но проявяват висока степен на генотоксичност, докато увреждането на ДНК, предизвикано от PLA2 субединица, може да се определи като умерено и не е свързано с неговата каталитична активност. Нашите резултати предполагат, че взаимодействията между субединиците на випоксин играят важна роля в HepG2 клетъчния отговор и най-вероятно влияят на наблюдаваното разграничение между цито- и генотоксичност.

23. Cell proliferation in in vivo-like three-dimensional cell culture is regulated by sequestration of ERK1/2 to lipid rafts

By R. Skrobanska, A. Evangelatov, N. Stefanova, T. Topouzova-Hristova, A. Momchilova and R. Pankov

Cell Prolif., 2014 doi: 10.1111/cpr.12112

Abstract:

Objectives: Regulatory mechanisms of cell proliferation have been extensively studied as they represent major challenges when dealing with pathologies such as fibrosis, tumourigenesis or tissue regeneration. Numerous in vitro studies still exploit conventional, two-dimensional cell cultures where cells are forced to adhere to unnaturally stiff and flat surfaces of culture dishes. In the living organism, however, each cell is in contact with components of the extracellular matrix and/or neighbouring cells, thus creating a complex threedimensional (3D) tissue structure. The current paper describes a native 3D culture of cells, based on the GD25b1 fibroblast cell line, and its use for investigating cell proliferation in in vivo-like conditions.

Materials and methods: Four-day post-confluent culture of GD25b1 fibroblasts resulted in formation of a 3D system of cells embedded in naturally synthesized extracellular matrix. Morphological characterization of the culture was performed by histochemistry, immunohistochemistry and immunofluorescence. Viability/proliferation was assayed by MTT testing, FACS analysis and Western blotting for determination of expression levels and activation status of the relevant signalling molecules.

Results: GD25b1 fibroblasts, grown as 3D culture, gave rise to tissue-like structures characterized by low level of apoptosis, low senescence and development of 3D matrix adhesions, typical of living tissues. Transition to three-dimensionality led to a switch from exponential to linear culture growth, accompanied by accumulation of activated ERK1/2 into caveolin-containing raft domains. Disruption of raft domains as well as reverse transition from 3D back to monolayer culture led to release of phosphorylated ERK1/2 from rafts, activation of cyclin D1 expression and increase in proliferation levels.

Conclusions: These results imply that under in vivo-like conditions, cells might achieve reduction of their proliferation level by sequestering activated ERK1/2 to lipid rafts.

Резюме:

Цели: Регулаторните механизми на клетъчната пролиферация са обстойно проучени, тъй като те представляват големи предизвикателства при работа с патологии като фиброза, туморогенеза или тъканна регенерация. Многобройни in vitro проучвания все още използват конвенционални, двуизмерни клетъчни култури, при които клетките са принудени да се придържат към неестествено твърди и плоски повърхности на съдовете за култивиране. В живия организъм обаче всяка клетка е в контакт с компоненти на извънклетъчния матрикс и/или съседни клетки, като по този

начин създава сложна триизмерна (3D) тъканна структура. Настоящата статия описва естествена 3D култура на клетки, базирана на клетъчна линия от фибробласти GD25b1, и нейното използване за изследване на клетъчна пролиферация в *in vivo* подобни условия.

Материали и методи: Четиридневно постконфлуентно култивиране на фибробласти GD25b1 доведе до образуване на 3D система от клетки, вградени в естествено синтезиран извънклетъчен матрикс. Морфологичното характеризирание на културата беше извършено чрез хистохимия, имунохистохимия и имунофлуоресценция. Жизнеспособността/пролиферацията беше анализирана чрез МТТ тест, FACS анализ и Western blotting за определяне на нивата на експресия и статуса на активиране на съответните сигнални молекули.

Резултати: GD25b1 фибробластите, отглеждани като 3D култура, образуваха тъканоподобни структури, характеризиращи се с ниско ниво на апоптоза, ниско стареене и развитие на 3D матрични адхезии, типични за живите тъкани. Преходът към триизмерност доведе до преминаване от експоненциален към линеен растеж на културата, придружен от натрупване на активиран ERK1/2 в рафт домени, съдържащи кавеолин. Разрушаването на рафтовите домени, както и обратният преход от 3D обратно към монослойна култура доведе до освобождаване на фосфорилиран ERK1/2 от рафтовете, активиране на експресията на циклин D1 и повишаване на нивата на пролиферация.

Закljučения: Тези резултати предполагат, че при условия, подобни на *in vivo*, клетките могат да постигнат намаляване на нивото на тяхната пролиферация чрез секвестриране на активиран ERK1/2 в липидни рафтове.

24. PREPARATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF NEW COLLAGEN COMPOSITES PART II: COLLAGEN/REDUCED GRAPHENE OXIDE COMPOSITES

Todorka G Vladkova, Iliana A Ivanova, Anna D Staneva, Madalina G Albu, Ahmed S A Shalaby, Tanya I Topousova, and Anelia S Kostadinova

J Arch Mil Med. e46406. doi: 10.5812/jamm.46406

Published online 2017 March 6.

Abstract

With the idea of exploring the biological activity of some newly synthesized chemical compounds and their combinations for development of novel antimicrobial collagen biomaterials, a serial investigation was initiated, starting with the preparation and biological activity study of Collagen/ZnTiO₃ nano-composites. This serial investigation continued with the preparation and biological activity study of new collagen-based composites in which self-prepared reduced graphene oxide (RGO) sheets were included as an antimicrobial agent. The new porous collagen/RGO composites demonstrated specific antimicrobial activity to different types microbial species; well pronounced activity against

gram-positive microorganisms (*Listeria innocua* and *Bacillus cereus*, both bacteria with typical chains forming, large size cells, and *Candida lusitaniae*, fungus with specific micelle organization) and lack of activity against gram-negative bacteria (*Pseudomonas putida*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*; all bacteria with small size cells) combined with lack of cytotoxicity to eukaryotic cells. For the first time, well-pronounced antifungal activity of collagen/RGO composites, depending on the RGO concentration was observed. Sterile zone of 17mm was measured for *C. lusitaniae* on collagen/RGO composite, 2:1 wt/wt. The possible mechanism of the biological activity of the new collagen/RGO composites was correlated with their characteristics and the specific cell morphology and size of the test microorganisms. The results of this investigation demonstrated that with their specific and adjustable bioactivity, the new collagen/RGO composites are promising antimicrobial biomaterial for variety of biomedical applications, including tissue engineering.

Резюме

Беше проведено серийно изследване, започващо с подготовката и оценяването на биологичната активност на нанокompозитите Collagen/ZnTiO₃, с идеята за изследване на биологичната активност на някои новосинтезирани химични съединения и техните комбинации за разработване на нови антимикробни колагенови биоматериали. Това серийно изследване продължи с подготовката и проучването на биологичната активност на нови композити на базата на колаген, в които самостоятелно приготвени листове от редуциран графенов оксид (RGO) бяха включени като антимикробен агент. Новите порести колаген/RGO композити демонстрират специфична антимикробна активност към различни типове микроорганизми; добре изразена активност срещу грам-положителни микроорганизми (*Listeria innocua* и *Bacillus cereus*, и двете бактерии с формиране на типични вериги, големи клетки и *Candida lusitaniae*, гъбички със специфична мицелна организация) и липса на активност срещу грам-отрицателни бактерии (*Pseudomonas putida*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*; всички бактерии с малък размер на клетките) в комбинация с липса на цитотоксичност към еукариотните клетки. За първи път се наблюдава добре изразена противогъбична активност на композитите колаген/RGO в зависимост от концентрацията на RGO. Стерилна зона от 17 mm беше измерена за *C. lusitaniae* върху колаген/RGO композит, 2:1 wt/wt. Възможният механизъм на биологичната активност на новите композити колаген/RGO е свързан с техните характеристики и специфичната клетъчна морфология и размер на тестовите микроорганизми. Резултатите от това изследване показаха, че със своята специфична и регулируема биоактивност, новите композити колаген/RGO са обещаващ антимикробен биоматериал за различни биомедицински приложения, включително тъканно инженерство.

25. METHOD FOR DETECTION OF POLYCATIONIC NANOPARTICLES LOADED WITH DNA IN EUKARYOTIC CELLS

By T. Topouzova-Hristova, K. Mladenova, V. Moskova-Doumanova, R. Kalinova, E. Haladjova, I. Dimitrov, S. Rangelov, J. Doumanov

Science & Technologies Volume V, Number 1, 2015, 87-91

ABSTRACT

Development of new delivery systems of biological macromolecules in eukaryotic cells is a scientific issue intensively studied in recent decades. Most of the methods used determine the general cytotoxicity or availability of product as a result of transfection, without considering the presence and behavior of the nanoparticles themselves in cells. This requires the development of methods proving effective penetration and movement of nanoparticles into cells. We propose a modified method by which one can trace the penetration of nanoparticles loaded with DNA in different cell cultures

РЕЗЮМЕ

Разработването на нови системи за доставяне на биологични макромолекули в еукариотни клетки е научен въпрос, интензивно изследван през последните десетилетия. Повечето от използваните методи определят общата цитотоксичност или наличността на продукта в резултат на трансфекция, без да отчитат присъствието и поведението на самите наночастици в клетките. Това налага разработването на методи, доказващи ефективното проникване и движение на наночастиците в клетките. Ние предлагаме модифициран метод, чрез който може да се проследи проникването на наночастици, натоварени с ДНК в различни клетъчни култури