

РЕЗЮМЕТА НА ПУБЛИКАЦИИТЕ НА ГЛ. АС. Д-Р ЕЛИЦА ПАВЛОВА,
ПРЕДСТАВЕНИ В КОНКУРСА ЗА ДОЦЕНТ
Моля, следвайте списъка от приложените таблици!

B1. Combined efficacy of oseltamivir, isoprinosine and ellagic acid in influenza A(H3N2)-infected mice

Elitsa L. Pavlova, Lora S. Simeonova, Galina A. Gegova

Biomedicine & Pharmacotherapy, vol. 98, February 2018, p. 29–35

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.014>

Abstract Influenza pathogenesis comprises a complex cascade of impaired cellular processes resulting from the viral replication and exaggerated immune response accompanied by reactive oxygen species (ROS) burst and oxidative stress, destructing membranous structures and tissues. By classical virological and biochemical methods we compared and evaluated the therapeutic effects of 2.5 mg/kg/day of the antiviral drug – oseltamivir (OS), 500 mg/kg/day of the immune modulator – isoprinosine (IP) and 500 mg/kg/day of the antioxidant agent ellagic acid (EA) with a focus on their combined activities in influenza H3N2 virus-infected mice. The survival, lung pathology and titers, as well as the oxidative stress biomarker thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the lungs, liver and blood plasma, correlated to the activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and glutathione reductase (GR) were assessed. We found that the viral inhibitor applied together with the immune modulator and the antioxidant exhibited strong therapeutic effects on the survival of the influenza-challenged mice. That effect was mostly pronounced for the triple combination – protection index (PI) of 75.2%, mean survival time (MST) extended by 5.8 days compared to the PBS control and significant reduction of the lung titers by 1.38 Δ lg; 2.3 scores lower lung pathology and 8 times reduction of the accumulated TBARS in the lungs and liver on the 5th day p.i. The enzymatic assays revealed that this combination demonstrated very good protection against the damaging superoxide radicals (83% efficiency of SOD, in comparison to healthy controls 100%). The double combinations of OS with IP and EA also showed protective effects according to the virological analysis – PI of 53.1% and 54.5%. Ten times higher GR activity was observed when the combination EA + OS and monotherapy of EA were applied (96% in comparison to healthy controls 100%). The best antioxidant effect in blood plasma was observed in the EA + IP group – 4 times reduction in the TBARS-content compared to infected controls but it did not have any efficacy on the survival and lung injury.

Keywords influenza, oxidative stress, oseltamivir, isoprinosine, ellagic acid

Резюме Патогенезата на грип включва сложна каскада от нарушени клетъчни процеси, резултат от вирусната репликация и засиления имунен отговор, придружен от свръхгенерация на активни форми на кислорода (АФК) и окислителен стрес, водещ до разрушаване на мембранни структури и тъкани. Чрез класически вирусологични и биохимични методи сравнихме и оценихме терапевтичните ефекти на 2.5 mg/kg/ден антивирусен препарат – оселтамивир (OS), 500 mg/kg/ден имуно-модулатор – изопринозин (IP) и 500 mg/kg/ден антиоксидант – елагова киселина (EA), с акцент върху комбинираната им активност при мишки, заразени с грипен вирус H3N2. Оценени бяха преживяването, белодробната патология и вирусните титри, както и биомаркерът за окислителен стрес, реактивни вещества на тиобарбитуровата киселина (TBARS) в белите дробове, черния дроб и кръвната плазма, свързани с активността на антиоксидантните ензими супероксид дисмутаза (SOD) и глутатион редуктаза (GR). Установихме, че вирусният инхибитор, приложен заедно с имуно-модулатора и антиоксиданта, проявява силни

терапевтични ефекти върху преживяването на мишките, заразени с вирус. Този ефект е най-изразен при тройната комбинация – индекс на защита (PI) 75.2%, средно време на преживяване (MST), удължено с 5.8 дни спрямо PBS контрола, значително намаляване на белодробните титри с 1.38 Δlg, 2.3 точки по-ниска белодробна патология и осемкратно намаляване на TBARS в белите дробове и черния дроб на петия ден след инфекцията. Ензимните анализи показаха, че тази комбинация демонстрира много добра защита срещу вредните супероксидни радикали (83% ефективност на SOD в сравнение със здравите контроли – 100%). Двойните комбинации на OS с IP и EA също показаха защитни ефекти според вирусологичния анализ – PI 53.1% и 54.5%. Десет пъти по-висока активност на GR се наблюдава при приложението на комбинацията EA + OS и при монотерапията с EA (96% спрямо здравите контроли – 100%). Най-добрият антиоксидантен ефект в кръвната плазма се наблюдава в групата EA + IP – четирикратно намаление на съдържанието на TBARS спрямо заразените контроли, но без ефект върху преживяемостта и белодробното увреждане.

Ключови думи грип, окислителен стрес, оселтамивир, изопринозин, елагова киселина

B2. Thin Hemoglobin Layers Deposited by MAPLE Technology

Evdokiya Belina, Christo Kisov, Elitsa Pavlova, Ekaterina Borisova, Georgi Dyankov

AIP Publishing, January 2019, AIP Conference Proceedings 2075, 160008 (2019).

<https://doi.org/10.1063/1.5091335>, ISSN: 0094-243X

Abstract Biosensing applications require high performance, including real-time monitoring of physiological events, detection of toxins, and advanced diagnostics. Such functionality will necessitate biosensors with increased sensitivity, specificity, and throughput, as well as the ability to simultaneously detect multiple analytes. To this end, we elaborate on one of bioprinting technologies - the matrix-assisted pulsed-laser evaporation (MAPLE) that is an advanced method for biomaterial deposition.

Резюме Биосензорните приложения изискват висока производителност, включително мониторинг на физиологични събития в реално време, откриване на токсини и усъвършенствана диагностика. Такава функционалност изисква биосензори с повишена чувствителност, специфичност и пропускателна способност, както и възможност за едновременна детекция на множество аналити. В тази връзка разработваме една от технологиите за биопечат – матрично асистираното пулсиращо лазерно изпарение (MAPLE), която е усъвършенстван метод за нанасяне на биоматериали.

B3. Comparative study on the activity of hemoglobin and myoglobin as recognition materials in biosensors

G. Dyankov, Ch. Kisov, E. Belina, E. Pavlova, E. Borisova, A. Gisbrecht and D. Ivanov

Proceedings of SPIE, vol. 11047, 2019, 1104705-1 – 1104705-6.

doi: 10.1117/12.2516536, ISSN: 0277786X

Abstract It was studied the bio-activity of hemoglobin (Hb) and myoglobin (Mb) films directly deposited or incorporated in matrix. The direct immobilization was performed by spin coating. The matrix-assisted pulsed-laser evaporation (MAPLE) technique was used for the matrix-assisted immobilization. The bio-activity was studied by measuring the resonance shift of Surface Plasmon Resonance (SPR). For the purpose, Hb and Mb films were deposited on a SPR transducer. Actually, we elaborated the first SPR sensor based on hemoglobin and myoglobin, to the best of our knowledge. The performance of both type of SPR chips – direct and MAPLE

immobilized was studied by SPR registration of the binding activity of myo- and hemo- globin ligands with carbon monoxide (CO), carbon dioxide (CO₂) and nitric oxide (NO).

Keywords: bio-sensing, hemoglobin, myoglobin, direct immobilization, MAPLE

Абстракт Изследвана е биоактивността на хемоглобинови (Hb) и миоглобинови (Mb) филми, директно депозиран или инкорпориран в матрица. Директната имобилизация е извършена чрез спин-покриване. За матрично асистираната имобилизация е използвана техника на матрично асистираното пулсиращо лазерно изпарение (MAPLE). Биоактивността е изследвана чрез измерване на резонансното изместване при повърхностен плазмонен резонанс (SPR). За тази цел Hb и Mb филми бяха депозиран върху SPR трансдюсер. Всъщност, до колкото ни е известно, разработихме първия SPR сензор на основата на хемоглобин и миоглобин. Производителността на двата типа SPR чипове – с директна и MAPLE имобилизация, бе изследвана чрез SPR регистрация на свързващата активност на лигандите на мио- и хемоглобин с въглероден оксид (CO), въглероден диоксид (CO₂) и азотен оксид (NO).

Ключови думи: био-сензори, хемоглобин, миоглобин, директна имобилизация, MAPLE

B4. Antioxidant activities of *Geranium sanguineum* L. polyphenolic extract in chemiluminescent model systems

Elitsa Pavlova, Lora Simeonova, Julia Serkedjieva

Inorganic Chemistry Communications, vol. 108, October 2019, 107518,
<https://doi.org/10.1016/j.inoche.2019.107518>

Abstract The aim of this study is to assess the antioxidant activities of *Geranium sanguineum* polyphenolic extract in chemiluminescent model systems by calculating the constants of inhibition towards different reactive oxygen species (ROS). The kinetics of lucigenin-enhanced chemiluminescence was examined in three chemical systems designed for generation of ROS ($\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2) and in one system with FeSO_4 added as a chelator. Antioxidant enzyme activities of superoxide dismutase and glutathione reductase were also evaluated. All the calculated constants of inhibition were compared to vitamin C and vitamin E values obtained earlier. Based on the results we can make the following major conclusions:

- 1) the polyphenol complex reacts against all studied ROS (H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$) with various efficacy. It exerts lower anti-oxidant effects when compared to standards such as vitamin C and vitamin E.
- 2) the polyphenol complex has pronounced chelation properties against Fe^{2+} , which is of extreme biological importance.
- 3) The reference concentration (0.1 mg/ml) is most appropriate for therapeutic purposes.

All obtained data contribute to the elucidation on the therapeutic and prophylactic reactive mechanisms of polyphenols extracted from *Geranium sanguineum* L.

Keywords polyphenols, antioxidants, reactive oxygen species, superoxide dismutase, glutathione reductase, chemiluminescence

Резюме Целта на това изследване е да се оцени антиоксидантната активност на полифенолния екстракт от *Geranium sanguineum* в хемилуминесцентни моделни системи чрез изчисляване на константите на инхибиране спрямо различни активни форми на кислорода (АФК). Изследвана беше кинетиката на луцигенин-активирана хемилуминесценция в три химични системи за генериране на АФК ($\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2) и в една система с добавен FeSO_4 , като хелатор. Оценена беше и активността на антиоксидантните

ензими супероксид дисмутаза и глутатион редуктаза. Всички изчислени константи на инхибиране бяха сравнени с получените по-рано стойности за витамин С и витамин Е. Въз основа на резултатите можем да направим следните основни заключения:

1. полифенолният комплекс реагира срещу всички изследвани АФК (H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$) с различна ефективност, като показва по-ниски антиоксидантни ефекти, в сравнение със стандартите витамин С и витамин Е
2. полифенолният комплекс има изразени хелаторни свойства срещу Fe^{2+} , което е от изключителна биологична значимост
3. референтната концентрация (0.1 mg/ml) е най-подходяща за терапевтични цели. Всички получени данни допринасят за изясняването на терапевтичните и профилактични реактивни механизми на полифенолите, извлечени от *Geranium sanguineum* L.

Ключови думи полифеноли, антиоксиданти, реактивни кислородни видове, супероксид дисмутаза, глутатион редуктаза, хемилуминесценция

B5. Antibacterial effect of $\text{TiO}_2\text{:Cu:Ag}$ thin coatings on *Pseudomonas* strain measured by microbiological and ATP assays

Iliana A. Ivanova, Elitsa L. Pavlova, Dragomira S. Stoyanova, Orlin I. Angelov

Journal of Basic Microbiology, October 2019, 59:1165–1172.

doi: 10.1002/jobm.201900427

Abstract The aim of this study is to investigate the antimicrobial properties of nanocomposite thin $\text{TiO}_2\text{:Cu:Ag}$ films on *Pseudomonas putida* as a natural isolate and an opportunistic pathogen. Several different methods were used to compare the antibacterial effect of thin $\text{TiO}_2\text{:Cu:Ag}$ layers obtained by radiofrequency magnetron sputter deposition against *P. putida*: optical density of the bacterial suspension, most probable number of survived cells, dehydrogenase activity inhibition, scanning electron microscopy images, atomic flame absorption spectroscopy, and adenosine triphosphate (ATP) luminescent assay. Optical density measurements and most probable plate count were in agreement and showed a strong bactericidal effect of the as-deposited and only bacteriostatic effect of the annealed coatings with the same metal content on tested bacteria. As the metal quantity in the medium rises during the first hour of the experiment, it could be suggested that this is the main reason for cell death. ATP-luminescent assay showed up to 18-fold reduction of the signal. It was compared with other microbiological and biochemical assays to prove the strong antibacterial effect of nanocomposite thin $\text{TiO}_2\text{:Cu:Ag}$ coatings with the possibilities of medical applications. Protection of medical devices against infections is a significant current challenge raised by an increasing number of medical devices-associated infections and microbial resistance to conventional antibiotic and multidrug treatments. Deposition of antimicrobial coatings is one of the current approaches to mitigate the problem.

Keywords bacterial growth, *Gracilicutes bacteria*, most probable vital cells number, RF magnetron sputtering, thin films

Резюме Целта на това изследване е да се проучат антимикробните свойства на нанокомпозитни тънки $\text{TiO}_2\text{:Cu}$ филми върху *Pseudomonas putida* като естествен изолат и опортюнистичен патоген. За сравнение на антибактериалния ефект на тънките $\text{TiO}_2\text{:Cu}$ слоеве, получени чрез радиочестотно магнетронно разпрашване върху *P. putida*, бяха използвани няколко различни метода: оптична плътност на бактериалната суспензия, най-вероятен брой на оцелелите клетки, инхибиране на дехидрогеназната

активност, сканираща електронна микроскопия, атомна пламъчна абсорбционна спектроскопия и луминесцентен аденозин трифосфат (АТФ) анализ. Измерванията на оптичната плътност и най-вероятният брой на жизнените клетки показаха силен бактерициден ефект на покритията и само бактериостатичен ефект на тези, които са отгряти, със същото съдържание на метали, върху тестваните бактерии. Тъй като количеството на метала в средата се увеличава през първия час на експеримента, може да се предполага, че това е основната причина за клетъчна смърт. АТФ-луминесцентният анализ показва до 18-кратно намаляване на сигнала. Той беше сравнен с други микробиологични и биохимични тестове, за да се докаже силният антибактериален ефект на нанокomпозитните тънки $\text{TiO}_2\text{:Cu}$ покрития с възможности за медицинско приложение. Защитата на медицинските устройства срещу инфекции е голямо предизвикателство, породено от нарастващия брой инфекции, свързани с медицински устройства и микробна резистентност към конвенционални антибиотици и многокомпонентни лечения. Нанасянето на антимикробни покрития е един от съвременните подходи за решаване на проблема.

Ключови думи бактериален растеж, бактерии *Gracilicutes*, най-вероятен брой жизнени клетки, радиочестотно магнетронно разпръскване, тънки филми

B6. Antiviral, cytotoxic and antioxidant effects of *Tanacetum vulgare* L. crude extract in vitro

Neli Vilhelmova, Lora Simeonova, Nadya Nikolova, Elitsa L. Pavlova, Zlatina Gospodinova, Georgi Antov, Angel S. Galabov, Ivanka Nikolova

Folia Medica, 2020, 62(1):172-179

doi: 10.3897/folmed.62.e49370

Abstract

Introduction: Due to the high prevalence of viral infections having no specific treatment and the constant emergence of resistant viral strains, searching for effective antiviral compounds is crucial. The present study explores in vitro the antiviral activity of ethanolic extract from aerial parts of *Tanacetum vulgare* L. against viral strains of three taxonomic groups, including agents that cause socially significant diseases in humans for which antiviral chemotherapy is indicated, namely coxsackievirus B1 (family *Picornaviridae*), herpes simplex virus type 1 (family *Herpesviridae*) and influenza A virus (family *Orthomyxoviridae*).

Aim: The aim of the current study was to evaluate antiviral activity of ethanolic extract from herbaceous plant *Tanacetum vulgare* L. against some important human viruses for which antiviral chemotherapy is needed and to characterize extract for its antioxidant activity *in vitro*.

Materials and methods: The crude aqueous ethanolic extract from aerial parts of *Tanacetum vulgare* L. contained flavonoids determined as apigenin, coumarins determined as aesculin, tannic compounds determined as tannin, and others. Antiviral activity of ethanolic extract from herbaceous plant *Tanacetum vulgare* L. against coxsackievirus B1, influenza A and herpes simplex virus type 1 was evaluated by viral yield reduction technique. The total antioxidant activity was determined by measuring the capacity of the sample to inhibit the generation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS).

Results: The results show that the extract has the lowest toxicity on the MDBK cell line and similar cytotoxicity in Hep-2, whereas in the MDCK cells it has more than twice the highest toxicity. Testing the antiviral activity of *Tanacetum vulgare* L. extract revealed a slight inhibition of replication of HSV-1 with a selective index of 7.07 and IAV/H3N2 (SI = 3.69) but no specific antiviral effect against CVB1 replication was found. The evaluation

of the antioxidant activity showed great antioxidant activity of the ethanolic extract from *T. vulgare* – 26 mmol/l for the applied 20 mg/ml extract.

Conclusion: The crude extract from aerial parts of the medicinal plant *Tanacetum vulgare* L. demonstrated low cytotoxicity in Hep-2, MDBK and moderate cytotoxic effects in MDCK cells. It exerted significant antiviral activity against HSV-1 as determined by the recorded inhibition of viral replication, the blockage of virus entry - absorption stage and direct virucidal effects on extracellular virions. The observed effect when testing *Tanacetum*'s extract on influenza A H3N2 virus infection in vitro was milder, which probably resulted from the interference with the cellular pathways involved in the replication cycle. The presence of virucidal and adsorption-suppressing activity but the absence of viral replication inhibitory effects against CVB1 suggests a possible interaction of the extract's components with viral capsid proteins or related cell receptors.

Keywords antioxidant activity, CVB1, H3N2, HSV-1, *Tanacetum vulgare* L.

Резюме

Въведение: Поради високата честота на вирусни инфекции, за които няма специфично лечение и непрекъснатото възникване на резистентни вирусни щамове, търсенето на ефективни антивирусни съединения е от съществено значение. Настоящото изследване изследва *in vitro* антивирусната активност на етанолов екстракт от надземните части на *Tanacetum vulgare* L. (вратига) срещу вирусни щамове от три таксономични групи, включително причинители на социално значими заболявания при хора, за които е показана антивирусна химиотерапия, а именно коксакивирус B1 (сем. *Picornaviridae*), херпес симплекс вирус тип 1 (сем. *Herpesviridae*) и вирус на грип А (сем. *Orthomyxoviridae*).

Цел: Целта на настоящото изследване е да се оцени антивирусната активност на етанолов екстракт от билката *Tanacetum vulgare* L. срещу някои важни човешки вируси, за които е необходима антивирусна терапия и да се характеризира екстрактът за антиоксидантна активност *in vitro*.

Материали и методи: Суровият водно-етанолов екстракт от надземните части на *Tanacetum vulgare* L. съдържа флавоноиди, определени като апигенин, кумарини, определени като ескулин, танинови съединения, определени като танин и други. Антивирусната активност на етаноловия екстракт от *Tanacetum vulgare* L. срещу коксакивирус B1, грип А и херпес симплекс вирус тип 1 беше оценена чрез техника за намаляване на вирусообразуването. Общата антиоксидантна активност беше определена чрез измерване на капацитета на пробата да инхибира генерирането на реактивни продукти на тиобарбитуровата киселина (TBARS).

Резултати: Резултатите показват, че екстрактът има най-ниска токсичност върху клетъчната линия MDBK и подобна цитотоксичност в Нер-2, докато в MDCK клетките показва повече от два пъти по-висока токсичност. Тестът за антивирусна активност на екстракта от *Tanacetum vulgare* L. показва слаба инхибция на репликацията на HSV-1 със селективен индекс 7,07 и IAV/H3N2 (SI = 3,69), но не показва специфичен антивирусен ефект срещу репликацията на CVB1. Оценката на антиоксидантната активност показва висока антиоксидантна активност на етаноловия екстракт от *T. vulgare* – 26 mmol/l за приложената концентрация от 20 mg/ml.

Заключение: Суровият екстракт от надземните части на лечебното растение *Tanacetum vulgare* L. демонстрира ниска цитотоксичност в Нер-2, MDBK и умерена цитотоксичност в MDCK клетки. Той проявява значителна антивирусна активност срещу HSV-1, установена чрез инхибиране на вирусната репликация, блокиране на вирусната абсорбция и директен вируциден ефект върху извънклетъчни вириони. Наблюдаваният ефект при тестване на екстракта от *Tanacetum* върху инфекцията с вируса на грип А H3N2 *in vitro* беше по-слаб, което вероятно се дължи на взаимодействие с клетъчни пътища,

участващи в репликационния цикъл. Наличието на вируцидна и абсорбционно-потискаща активност, но липса на инхибиращи ефекти върху вирусната репликация срещу CBV-1, предполага възможно взаимодействие на компонентите на екстракта с вирусните капсидни протеини или свързани клетъчни рецептори.

Ключови думи антиоксидантна активност, CVB1, H3N2, HSV-1, *Tanacetum vulgare* L.

B7. Prooxidant and antimicrobial effects of iron and titanium oxide nanoparticles and thalicarpine

Elitsa L. Pavlova, Radostina D. Toshkovska, Tsvetelina E. Doncheva, Iliana A. Ivanova

Archives of Microbiology 2020, 202(7), 1873-1880

<https://doi.org/10.1007/s00203-020-01902-2>

<https://rdcu.be/b4nWp>

Abstract The aim is to evaluate the prooxidant and antimicrobial effects of Fe₃O₄ and TiO₂ nanoparticles and thalicarpine by luminescent and standard microbiological assays. Their effect on the kinetics of free-radical oxidation reactions (at pH 7.4 and pH 8.5) is studied in the following model systems, using activated chemiluminescence: chemical, with Fenton's reagent (H₂O₂-FeSO₄) — for the generation of hydroxyl radicals ($\cdot$ OH); chemical, with oxidant hydrogen peroxide (H₂O₂); chemical (NAD.H - PhMS), for the generation of superoxide radicals (O₂⁻). Fe₃O₄ nanoparticles exhibit highly pronounced antioxidant properties; TiO₂ nanoparticles exhibit mild to moderate prooxidant properties at neutral and alkaline conditions. Those properties are tested by the chemiluminescent method for the first time. Thalicarpine and its combination with TiO₂ nanoparticles exhibit pronounced antioxidant activities at pH 8.5 which are lost and transformed into well-presented prooxidant effects at pH 7.4. That is a result-supported proof on the observed typical properties of thalicarpine and TiO₂, namely antibacterial, organic-preserving and anti-pathogenic activities. The antimicrobial effect is tested on Gram-positive and Gram-negative bacteria: two strains of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* 1095 and *Staphylococcus aureus*. All bacteria are destroyed after the application of TiO₂, but not Fe₃O₄ nanoparticles, showing their antibacterial effect. Thalicarpine, in combination with TiO₂, showed even synergetic antibacterial effect.

Keywords nanoparticles, Fe₃O₄, TiO₂, alkaloid thalicarpine, reactive oxygen species, microorganisms

Резюме Целта е да се оценят прооксидантните и антимикробните ефекти на наночастици Fe₃O₄ и TiO₂ и таликарпин чрез луминесцентни и стандартни микробиологични тестове. Техният ефект върху кинетиката на реакциите на свободнорадикално окисление (при pH 7.4 и pH 8.5) е изследван в следните моделни системи, използвайки активирана хемилуминесценция: химична система с реактив на Фентън (H₂O₂-FeSO₄) — за генериране на хидроксилни радикали ($\cdot$ OH); химична система с окислителя водороден пероксид (H₂O₂); химична система (NAD.H - PhMS), за генериране на супероксидни радикали (O₂⁻). Наночастиците Fe₃O₄ показват силно изразени антиоксидантни свойства, докато наночастиците TiO₂ проявяват слаби до умерени прооксидантни свойства в неутрална и алкална среда. Тези свойства бяха тествани чрез хемилуминесцентен метод за първи път. Таликарпинът и неговата комбинация с наночастици TiO₂ показват изразена антиоксидантна активност при pH 8.5, която се губи и се трансформира в изразени прооксидантни ефекти при pH 7.4. Това е доказателство за наблюдаваните типични свойства на таликарпин и TiO₂, а именно антибактериални, съхраняващи органичната компонента, както и антипатогенни активности. Антимикробният ефект е изследван върху Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии: два щама на *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* 1095 и

Staphylococcus aureus. Всички бактерии бяха унищожени след прилагането на TiO_2 , но не и на наночастици Fe_3O_4 , което показва антибактериалния им ефект. Таликарпинът в комбинация с TiO_2 показва дори синергичен антибактериален ефект.

Ключови думи наночастици, Fe_3O_4 , TiO_2 , алкалоид таликарпин, активни форми на кислорода, микроорганизми

G1. Preventive effect of a polyphenol-rich extract from *Geranium sanguineum* L. on hepatic drug metabolism in influenza infected mice

Silviya Abarova, Lyubka Tancheva, Rumen Nikolov, Julia Serkedjieva, Elitsa Pavlova, Alessia Bramanti, Ferdinando Nicoletti, Nikolay Tzvetkov

Scientia Pharmaceutica 2020, vol. 88, issue 4, 45

doi:10.3390/scipharm88040045

Abstract: The decreased hepatic drug metabolism (predominately first phase) is one of the essential reasons for numerous side effects and for increased drug toxicity during influenza virus infection (IVI). The present study aims to investigate some mechanisms of the preventive effect of a standardized polyphenol complex from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L. (PPhC) (10 mg/kg nasally). A verified experimental model of IVIA/Aichi/2/68 (H3N2) (4.5 lg LD50) in male ICR (Institute of Cancer Research, USA) mice was used. Changes in hepatic monooxygenase activities as well as nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) - cytochrome C reductase activity and cytochrome P450 content were studied on days 2, 6, 9, 21 of the infection together with thiobarbituric acid reactive substances in the liver supernatant. Our data clearly demonstrates that IVI affects all components of the electronic chain of cytochrome P-450. N-demethylases and hydroxylases as well as the activity of cytochrome C reductase and cytochrome P-450 content were decreased in the course of the virus infection. This implies that free radicals play an important role not only in the pathogenesis of IVI, but also in the modulation of the hepatic monooxygenase activity. This is also consistent with the established polyphenol complex PPhC from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L. preventive effect against increased thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)-levels. PPhC restored most of the monooxygenase activities that were inhibited in IVI animals, even over the control levels, probably via multiple mechanisms that may entail antioxidant activity and selective antiviral and protein-binding effects. In contrast to infected animals, in healthy mice, PPhC showed moderate reversible inhibitory effect on hepatic monooxygenase activities.

Keywords: cytochrome P450 monooxygenases, antioxidants, polyphenols, *Geranium sanguineum* L., influenza virus infection

Резюме Намаленият лекарствен чернодробен метаболизъм (предимно първа фаза) е една от основните причини за множество странични ефекти и повишена токсичност на лекарствата при грипна вирусна инфекция (ГВИ). Настоящото изследване цели да изследва някои механизми на превантивния ефект на стандартизиран полифенолен комплекс от лечебното растение *Geranium sanguineum* L. (PPhC), (кръвен здравец), приложен 10 mg/kg назално. Използван е доказан експериментален модел на ГВИ A/Aichi/2/68 (H3N2) (4.5 lg LD50) при мъжки мишки от щам ICR (Institute of Cancer Research, САЩ). Промените в чернодробните монооксигеназни активности, както и активността на никотинамид аденин динуклеотид фосфат (NADPH) - цитохром С редуктазата и съдържанието на цитохром P450, са изследвани на 2, 6, 9 и 21 ден от инфекцията, заедно с нивата на реактивни продукти на тиобарбитурова киселина (ТБКРП) в чернодробния супернатант. Нашите данни ясно показват, че ГВИ засяга всички компоненти на

електронната верига на цитохром Р-450. Активността на N-деметиلاзите и хидроксилазите, както и активността на цитохром С редуктазата и съдържанието на цитохром Р-450, са намалени в хода на вирусната инфекция. Това предполага, че свободните радикали играят важна роля не само в патогенезата на ГВИ, но и в модулацията на чернодробната монооксигеназна активност. Това е в съответствие с установения превантивен ефект на полифенолния комплекс PPhC от лечебното растение *Geranium sanguineum* L. срещу повишени нива на ТБКРП. PPhC възстановява повечето от монооксигеназните активности, които са инхибирани при животни с ГВИ, дори над контролните нива, вероятно чрез множество механизми, които могат да включват антиоксидантна активност и селективни антивирусни и протеин-свързващи ефекти. За разлика от инфектираните животни, при здрави мишки PPhC показва умерен обратим инхибиторен ефект върху чернодробните монооксигеназни активности.

Ключови думи цитохром Р450 монооксигенази, антиоксиданти, полифеноли; *Geranium sanguineum* L., грипна вирусна инфекция

G2. Alternative technique for direct immobilization of biomolecules

E. Belina, J. S. Karadjov, K. Shindarova, E. Pavlova, T. L. Dimitrova, H. Kisov and G. Dyankov

2021 *J. Phys.: Conf. Ser.* **1859** 012061

doi:10.1088/1742-6596/1859/1/012061

Abstract The conventional approach to immobilization of biomolecules on the transducer of biosensors requires their embedding into the so-called embedding matrix. The procedure is complicated and laborious and performed by chemical means. As a results, not only biomolecules, but also other substances are deposited on the desired surface. This leads to reduced sensitivity and specificity due to the non-specific reactions with the molecules of the embedding matrix. Immobilization without embedding matrix (the so-called direct immobilization) guarantees the specificity of the biosensor and increases the sensitivity and accuracy. The main challenge in implementing this strategy is to preserve the bioactivity of the ligand. We have successfully solved the problem by using the matrix-assisted pulsed laser evaporation (MAPLE) technique. Here we report the properties of hemin directly immobilized on the transducer of a biosensor based on surface plasmon resonance (SPR).

Резюме Конвенционалният подход за имобилизация на биомолекули върху трансдюсера на биосензори изисква тяхното вграждане в т.нар. вграждаща матрица. Тази процедура е сложна и трудоемка и се изпълнява по химичен път. В резултат на това се отлагат не само биомолекулите, но и други вещества върху желаната повърхност, което води до намалена чувствителност и специфичност поради неспецифичните реакции с молекулите на вграждащата матрица. Имобилизацията без вграждаща матрица (т.нар. директна имобилизация) гарантира специфичността на биосензора и увеличава чувствителността и точността. Основното предизвикателство при прилагането на тази стратегия е запазването на биоактивността на лиганда. Успешно решихме този проблем, използвайки техниката на пулсова лазерна евапорация с асистенция на матрица (MAPLE). Тук докладваме свойствата на хемин, директно имобилизиран върху трансдюсера на биосензор, базиран на повърхностен плазмонен резонанс (SPR).

G3. Investigation of biological and prooxidant activity of zinc oxide nanoclusters and nanoparticles

Iliana A. Ivanova, Elitsa L. Pavlova, Aneliya S. Kostadinova, Radostina D. Toshkovska, Lyubomira D. Yocheva, Kh El-Sayed, Mohamed A. Hassan, Heba ElSayed ElZorkany, Hisham A. Elshoky

Acta Chimica Slovenica, 2022, 69(3), 722–733

Abstract Zinc oxide (ZnO) nanomaterials offer some promising antibacterial effects. In this study, a new form of ZnO is synthesized, named ZnO nanocluster bars (NCs). Herein, ZnO NCs, ZnO nanoparticles (NPs), ZnO coated with silica (ZnOSiO_A, ZnO-SiO_B), and SiO₂ NPs were prepared, characterized, and their antimicrobial and prooxidant activity were tested. The prooxidant activity of all nanomaterials was studied according to free-radical oxidation reactions (pH 7.4 and pH 8.5) in chemiluminescent model systems. Each form of new synthesized ZnO nanomaterials exhibited a unique behavior that varied from mild to strong prooxidant properties in the Fenton's system. ZnO NPs and ZnO NCs showed strong antibacterial effects, ZnO-SiO_A NPs did not show any antibacterial activity representing biocompatibility. All tested NMs also underwent oxidation by H₂O₂. ZnO NCs and ZnO NPs exhibited strong oxidation at pH 8.5 in the O₂⁻ generating system. While, SiO₂, ZnO-SiO_A and ZnO-SiO_B possessed pronounced 60–80% antioxidant effects, SiO₂ NPs acted as a definitive prooxidant which was not observed in other tests. ZnO NCs are strong oxidized, assuming that ZnO NCs provide a slower release of ZnO, which leads to having a stronger effect on bacterial strains. Thus, ZnO NCs are an important antibacterial agent that could be an emergent replacement of traditional antibiotics.

Keywords ZnO, nanoclusters, nanocomposites, antimicrobial activity, ROS, chemiluminescence

Резюме Наноматериалите от цинков оксид (ZnO) показват обещаващи антибактериални ефекти. В това изследване е синтезирана нова форма на ZnO, наречена ZnO наноклъстерни пръчици (NCs). Приготвени, характеризирани и тествани са ZnO NCs, ZnO наночастици (NPs), ZnO покрит със силиций (ZnOSiO_A, ZnO-SiO_B) и SiO₂ NPs за антимикробна и прооксидантна активност. Прооксидантната активност на всички наноматериали е изследвана в реакции на свободно-радикално окисление (pH 7.4 и pH 8.5) в хемилуминесцентни моделни системи. Всяка форма на новосинтезираните ZnO наноматериали прояви уникално поведение, вариращо от слаби до силни прооксидантни свойства в системата на Фентън. ZnO NPs и ZnO NCs показаха силни антибактериални ефекти, докато ZnO-SiO_A NPs не проявиха антибактериална активност, показвайки биосъвместимост. Всички тествани наноматериали бяха също подложени на окисление с H₂O₂. ZnO NCs и ZnO NPs показаха силна оксидация при pH 8.5 в системата за генериране на O₂⁻. SiO₂, ZnO-SiO_A и ZnO-SiO_B проявиха изразен антиоксидантен ефект от 60-80%, докато SiO₂ NPs се проявиха като изразен прооксидант, което не беше наблюдавано в други тестове. ZnO NCs се окисляват силно, предполагайки, че ZnO NCs осигуряват по-бавно освобождаване на ZnO, което води до по-силен ефект върху бактериалните щамове. По този начин ZnO NCs са важен антибактериален агент, който би могъл да бъде потенциален заместител на традиционните антибиотици.

Ключови думи ZnO, наноклъстери, нанокomпозити, антимикробна активност, ROS, хемилуминесценция

Г4. Prooxidant, antioxidant and biological activity of nanocomposites of reduced graphene oxide, silver, copper and their combinations

Elitsa L. Pavlova, Iliana A. Ivanova, Anna D. Staneva, Aneliya S. Kostadinova, Diana G. Kichukova, Lyubomira D. Yocheva

Chemical Papers 2022

<https://doi.org/10.1007/s11696-022-02360-4>

Abstract The study aimed to evaluate the prooxidant, antioxidant and biological activities of newly synthesized nanocomposites of reduced graphene oxide (RGO) and its combinations with silver and copper by luminescent

and microbiological assays. The antimicrobial activity was tested in a liquid medium during 24 h against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The Gram-positive bacteria were more resistant than the Gram-negative. Strongest antibacterial effect was demonstrated by the graphene nanocomposite decorated with silver and copper. The cubic silver nanoclusters size 30 nm showed better bacteriostatic effect than the spherical nanoparticles on reduced graphene sheets with 43 nm diameter. The eukaryotic cell cytotoxicity effect was evaluated with two cell lines — MDCK kidney epithelium noncancerous cells and A549 lung cancerous epithelium cells, tested in cell culture medium for 24 h. Our results showed that RGO Ag:Cu had stronger cytotoxic effect on eukaryotic cells. We have discovered that the cancerous A549 cells show stronger sensitivity to the nanomaterials than the noncancerous MDCK-cells. The pro- and antioxidant activity of all nanomaterials was studied according to the free-radical oxidation reactions (pH 7.4 and pH 8.5) in the following chemiluminescent model systems: (1) chemical, with Fenton's reagent (H_2O_2 - FeSO_4), for the generation of hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$), (2) chemical, with oxidant hydrogen peroxide (H_2O_2), (3) chemical (NAD.H-PhMS), for the generation of superoxide radicals ($\text{O}_2^{\cdot-}$). All tested nanomaterials presented definitive antioxidant activity in both tested media at neutral and alkaline pH. The only exception was RGO Ag nanoparticles, sized 30 nm, that exhibited less than 10% prooxidant activity in the Fenton's system, at pH 8.5. Those results support the idea to use such nanomaterials in body implants.

Keywords graphene oxide, silver, copper, nanoparticles, toxicity

Резюме Настоящото проучване има за цел да оцени прооксидантната, антиоксидантната и биологичната активност на новосинтезирани нанокомпозити от редуциран графенов оксид (RGO) и неговите комбинации със сребро и мед чрез луминесцентни и микробиологични тестове. Антимикробната активност беше тествана в течна среда за 24 часа срещу *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Грам-положителните бактерии се оказаха по-устойчиви, в сравнение с Грам-отрицателните. Най-силен антибактериален ефект демонстрира графеновият нанокомпозит, надграден със сребро и мед. Кубичните сребърни наноклъстери с размер 30 nm показаха по-добър бактериостатичен ефект от сферичните наночастици върху редуцираните графенови листове с диаметър 43 nm. Цитотоксичният ефект върху еукариотни клетки беше оценен с две клетъчни линии — неканцерогенни клетки от бъбречен епител (MDCK) и канцерогенни епителни клетки от бели дробове (A549), тествани в клетъчна култура за 24 часа. Резултатите показаха, че RGO:Ag има по-силен цитотоксичен ефект върху еукариотни клетки. Установихме, че канцерогенните клетки A549 проявяват по-голяма чувствителност към наноматериалите, в сравнение с неканцерогенните MDCK клетки. Про- и антиоксидантната активност на всички наноматериали беше изследвана спрямо реакциите на свободно-радикално окисление (pH 7.4 и pH 8.5) в следните хемилуминесцентни моделни системи: (1) химична, с реагент на Фентън (H_2O_2 - FeSO_4), за генериране на хидроксилни радикали ($\cdot\text{OH}$), (2) химична, с окислител водороден пероксид (H_2O_2), (3) химична (NAD.H - PhMS), за генериране на супероксидни радикали ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Всички тествани наноматериали показаха ясно изразена антиоксидантна активност и при неутрално и при алкално pH. Единственото изключение бяха RGO:Ag наночастици с размер 30 nm, които проявиха по-малко от 10% прооксидантна активност в системата на Фентън при pH 8.5. Тези резултати подкрепят идеята за използване на такива наноматериали в телесни импланти.

Ключови думи графенов оксид, сребро, мед, наночастици, токсичност

G5. Biological activity of graphene nanocomposites with zinc oxide, Cu and Ag nanoparticles

Boris Martinov, Elitsa Pavlova, Iliana Ivanova, Lyubomira Yocheva, Anelia Kostadinova, Anna Staneva

Abstract The aim of this research is to obtain collagen nanocomposites based on graphene, graphene oxide, GO, zinc oxide and metal nanoparticles and to evaluate their pro-, antioxidant and biological activities by luminescent and standard microbiological assays. The antimicrobial activity of graphene composites with added nanosized zinc oxide, silver and copper nanoparticles was tested on Firmicutes bacteria *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 1228) and Gracillicutes *Escherichia coli* (ATCC 25922). The method of diffusion in agar was used in three variants - spot diffusion, well and paper-disc diffusion. The spot and diffusion disc approaches of the method have shown better effect than the well diffusion for testing the effect of graphene composites on bacteria. The composites with high ZnO content had the best antimicrobial properties against the tested bacteria. The cytotoxicity of the nanocomposites using normal MDCK and A549 epithelial sarcoma cells were tested for 24 h at a concentration of 100 mg mL⁻¹. Cancer cells were found to be more sensitive than normal to the graphene composites, proving antitumor activity. The pro- and antioxidant effects of the tested nanomaterials depend on the pH level. At physiological conditions, in the Fenton's system, all but RGO+Cu do not appear to be suitable as an implant nanomaterial. In the H₂O₂ oxidation system all materials present stable antioxidant effects; only ZnO+RGO+Cu is close to control prooxidant levels. When the nanomaterials are tested for oxidation by O₂⁻ radicals, ZnO+RGO and Zn+RGO+Cu show prooxidant effects, as the prooxidant activity is kept for ZnO+RGO even at physiological acidity pH 7.4.

Keywords nanocomposites, pro- and antioxidant effects, graphene, biological activity, cytotoxicity

Резюме Целта на това изследване е да се получат колагенови нанокомпозиции, базирани на графен, графенов оксид, GO, цинков оксид и метални наночастици и да се оценят техните про-, антиоксидантни и биологични активности чрез луминесцентни и стандартни микробиологични анализи. Антимикробната активност на графеновите композиции с добавени наноразмерни частици цинков оксид, сребро и мед беше тествана върху бактерии от тип Firmicutes *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 1228) и Gracillicutes *Escherichia coli* (ATCC 25922). Беше използван методът на дифузия в агар в три варианта - спот дифузия, дифузия чрез кладенче и дискова дифузия. Спот и дисковата дифузия показаха по-добър ефект в сравнение с дифузията чрез кладенче при тестване на ефекта на графеновите композиции върху бактериите. Композитите с високо съдържание на ZnO показаха най-добри антимикробни свойства срещу тестваните бактерии. Цитотоксичността на нанокомпозициите беше тествана върху здрави MDCK и A549 саркомни клетки за 24 часа при концентрация от 100 mg mL⁻¹. Раковите клетки се оказаха по-чувствителни от здравите към графеновите композиции, доказвайки антитуморна активност. Про- и антиоксидантните ефекти на тестваните наноматериали зависят от нивото на рН. При физиологични условия, в системата на Фентън, всички материали освен RGO+Cu, се оказаха неподходящи като имплантни наноматериали. В системата на окисление с H₂O₂ всички материали показват стабилни антиоксидантни ефекти, като единствено ZnO+RGO+Cu е близък до контролата по отношение на прооксидантните нива. При тестване на наноматериалите за окисление чрез O₂⁻ радикали, ZnO+RGO и Zn+RGO+Cu показват прооксидантни ефекти, като прооксидантната активност се запазва за ZnO+RGO дори при физиологично рН 7.4.

Ключови думи нанокомпозиции, про- и антиоксидантни ефекти, графен, биологична активност, цитотоксичност

Г6. Susceptibility of SARS COV-2 nucleocapsid and spike proteins to reactive oxygen species and role in inflammation

Elitsa Pavlova, Petya Genova-Kalou, Georgi Dyankov

Analytical Biochemistry, 2023, 115137, ISSN 0003-2697

<https://doi.org/10.1016/j.ab.2023.115137>

Abstract Chemiluminescence was used to test the susceptibility of the SARS-CoV-2 N and S proteins to oxidation by reactive oxygen species (ROS) at pH 7.4 and pH 8.5. The Fenton's system generates various ROS (H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, ^-OH , $\cdot\text{OOH}$). All proteins were found to significantly suppress oxidation (the viral proteins exhibited 25–60% effect compared to albumin). In the second system, H_2O_2 was used both as a strong oxidant and as a ROS. A similar effect was observed (30–70%); N protein approached the effect of albumin at physiological pH (~45%). In the $\text{O}_2^{\cdot-}$ -generation system, albumin was most effective in the suppression of generated radicals (75%, pH 7.4). The viral proteins were more susceptible to oxidation (inhibition effect no more than 20%, compared to albumin). The standard antioxidant assay confirmed the strong antioxidant capacity of both viral proteins (1.5–1.7 fold higher than albumin). These results demonstrate the effective and significant inhibition of ROS-induced oxidation by the proteins. Obviously, the viral proteins could not be involved in the oxidative stress reactions during the course of the infection. They even suppress the metabolites involved in its progression. These results can be explained by their structure. Probably, an evolutionary self-defense mechanism of the virus has been developed.

Keywords SARS-CoV-2 nucleocapsid protein, SARS-CoV-2 spike protein, ROS, chemiluminescence, antioxidant activity, inflammation

Резюме За изследване на податливостта на SARS-CoV-2 N и S протеините към окисление от активни форми на кислорода (АФК) при pH 7.4 и pH 8.5 беше използвана хемилуминесценция. Системата на Фентън генерира различни АФК (H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, ^-OH , $\cdot\text{OOH}$). Беше установено, че всички изследвани протеини значително потискат окислението (вирусните протеини показаха 25–60% ефект, в сравнение с албумин). Във втората система H_2O_2 беше използван както като силен оксидант, така и като АФК. Наблюдава се подобен ефект (30–70%); N протеинът доближи ефекта на албумин при физиологично pH (~45%). В системата за генериране на $\text{O}_2^{\cdot-}$, албуминът беше най-ефективен в потискането на генерираните радикали (75%, pH 7.4). Вирусните протеини бяха по-податливи на окисление (ефект на инхибиране не повече от 20%, спрямо албумин). Стандартният антиоксидантен тест потвърди силния антиоксидантен капацитет на двата вирусни протеина (1.5–1.7 пъти по-висок от този на албумин). Тези резултати демонстрират ефективното и значително инхибиране на окислението, индуцирано от АФК, от тези протеини. Очевидно, вирусните протеини не могат да участват в реакциите на окислителен стрес по време на инфекцията. Те дори потискат метаболитите, участващи в нейното развитие. Тези резултати могат да бъдат обяснени със структурата им. Вероятно, вирусът еволюционно е развил механизъм на самозащита (срещу АФК на имунната система).

Ключови думи SARS-CoV-2 нуклеокапсиден протеин, SARS-CoV-2 спайк протеин, АФК, хемилуминесценция, антиоксидантна активност, възпаление

Г7. The effect of resistin on the redox state of breast cancer cells

Elitsa Pavlova, Radoslav Stojchevski, Dimiter Avtanski

Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2024, volume 150, article number 24

Abstract

Purpose Resistin is an inflammatory cytokine secreted mostly by adipocytes and immune cells that plays a role in the development of insulin resistance, diabetes, and cancer. We hypothesized that resistin's inflammatory activity influences the free radical and oxidative stress pathways.

Methods We used human breast carcinogenic (MCF-7 and MDA-MB-231) and non-carcinogenic (MCF-10A) cells in this investigation and correlated the absorbed resistin concentration with the change in oxidative stress (TBARS, carbonated proteins) and antioxidant activity (Antioxidant Capacity, SuperOxideDismutase, CATalase, Glutathione Peroxidase).

Results Resistin was substantially more effective as a prooxidant at lower (12.5 ng/ml) concentrations, than at higher concentrations (25.0 ng/ml). Vitamin C did not appear to be an effective oxidative stress protector at antioxidant concentrations of $5 \cdot 10^{-4}$ M. Leptin, at 100 ng/ml, did not result in conclusive oxidative stress or antioxidant defence stimulation, as expected.

Conclusion Taken together, the findings support resistin's role as a non-oxidative stress marker and a metabolic signaling molecule.

Keywords oxidative stress, antioxidant activity, resistin, leptin, vitamin C, breast cancer

Резюме

Цел Резистинът е възпалителен цитокин, секретиран основно от адипоцити и имунни клетки, който играе роля в развитието на инсулинова резистентност, диабет и рак. Предположихме, че възпалителната активност на резистин влияе върху свободнорадикалните и пътищата на окислителен стрес.

Методи В това изследване използвахме човешки канцерогенни клетки от рак на гърдата (MCF-7 и MDA-MB-231) и неканцерогенни клетки (MCF-10A) и корелирахме абсорбираната концентрация на резистин с промените в оксидативния стрес (ТБКРП, карбонирани протеини) и антиоксидантната активност (Антиоксидантен Капацитет, СуперОксидДисмутаза, Каталаза, Глутатион Пероксидаза).

Резултати Резистинът беше значително по-ефективен като прооксидант при по-ниски концентрации (12.5 ng/ml), отколкото при по-високи концентрации (25.0 ng/ml). Витамин С не показва ефективност като протектор срещу окислителния стрес при антиоксидантни концентрации от $5 \cdot 10^{-4}$ M. Лептинът, при 100 ng/ml, не доведе до значителна стимулация на окислителния стрес или антиоксидантна защита, както се очакваше.

Заклучение Взети заедно, резултатите подкрепят ролята на резистин като маркер за неокислителен стрес и като метаболитна сигнална молекула.

Ключови думи окислителен стрес, антиоксидантна активност, резистин, лептин, витамин С, рак на гърдата

Г8. Copper And Copper Nanoparticles Applications And Their Role Against Infections: A Minireview

Iliana A. Ivanova, Dragomira S. Daskalova, Lilia P. Yordanova, Elitsa L. Pavlova

Processes, SI: Synthesis and Application of Nanostructured Metal and Metal Oxides, 2024, 12(2):352
<https://doi.org/10.3390/pr12020352>

Abstract The focus of this review article is to present a retrospective analysis of copper applications focusing on ions and nanoparticles as broad-spectrum antimicrobials. Copper nanoparticles are presented as an alternative to

rising antibiotic resistance. The basic mechanisms of bacterial, fungal, and viral inactivation, which explain their potential, are presented. The green biosynthesis of copper nanoparticles using biomaterials is also presented and considered a very promising trend for future biotechnology and medical applications.

Keywords antibacterial, antifungal, antiviral, copper, nanoparticles, coatings

Резюме Тази обзорна статия прави ретроспективен анализ на приложенията на мед, фокусирайки се върху йони и наночастици като широкоспектърни антимикробни агенти. Медните наночастици са представени като алтернатива на нарастващата антибиотична резистентност. Представени са основните механизми за бактериална, фунгицидна и вирусна инактивация, които обясняват техния потенциал. Зеленият биосинтез на медни наночастици с използване на биоматериали също е разгледан и се смята за много обещаваща тенденция за бъдещи биотехнологични и медицински приложения.

Ключови думи антибактериален, противогъбичен, антивирусен, мед, наночастици, покрития

G9. Evaluation of the viability of the Bulgarian BCG vaccine by the adenosine triphosphate assay

Elitsa Pavlova, Alexander Mihaylov, Tzvetelina Stefanova

Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2024, 38(1), Article: 2333905

<http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2024.2333905>

Abstract We applied a modified assay for the measurement of the intracellular ATP content as an alternative biochemical method for estimating the viability of the BCG vaccine instead of the standard cultural microbiological assay. Eight lyophilized BCG ampoule samples (Lot 287-2 and Lot 254-2, Bulgarian BCG strain SL222 Sofia) were tested on different days. Each calibration curve was measured for the following range of ATP concentrations: 100, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, and 0.1562 pmol. The obtained results were compared to the traditional cultural colony counting method for evaluating the viability of the BCG vaccine. The NCP of Lot 287-2 (min 2.325–max 3.300) was higher in comparison to Lot 254-2 (min 1.438–max 3.330). That result corresponded to higher ATP-content registered for Lot 287-2 (min 0.409–max 1.338) than Lot 254-2 (min 0.18–max 1.104). Our results confirmed the observation made by other researchers that the modified ATP assay is a reliable, simple, and quick method for the evaluation of the viability of the BCG vaccine. Additional compiled data about all BCG strains are needed to perform studies on the correlation between the luciferin-luciferase bioluminescent ATP assay and the cultural method for viability and enumeration of the units in the lyophilized BCG vaccine.

Keywords luminescence, ATP, CFU, BCG, vaccine, method

Резюме Приложихме модифициран метод за измерване на вътреклетъчното съдържание на АТФ като алтернативен биохимичен метод за оценка на жизнеспособността на БЦЖ ваксина вместо стандартния културален микробиологичен метод. Бяха тествани осем ампули с лиофилизирана БЦЖ ваксина (Lot 287-2 и Lot 254-2, Български БЦЖ щам SL222 Sofia) в различни дни. За всяка калибрационна права бяха измерени следните концентрации на АТФ: 100, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 и 0.1562 pmol. Получените резултати бяха сравнени с традиционния метод на културално преброяване на колонии за оценка на жизнеспособността на БЦЖ ваксина. NCP за Lot 287-2 (мин. 2.325–макс. 3.300) беше по-висок, в сравнение с Lot 254-2 (мин. 1.438–макс. 3.330). Този резултат съответстваше на по-високото съдържание на АТФ, регистрирано за Lot 287-2 (мин. 0.409–макс. 1.338) спрямо Lot 254-2 (мин. 0.18–макс. 1.104). Нашите резултати потвърдиха наблюдението на други изследователи, че модифицираният метод за

измерване на АТФ е надежден, прост и бърз за оценка на жизнеспособността на БЦЖ ваксина. Необходими са допълнителни данни за всички БЦЖ щамове, за да се проведат изследвания на корелацията между биолуминесцентния луциферин-луцифераза АТФ метод и културалния метод за оценка на жизнеспособността и броя на единиците в лиофилизирана БЦЖ ваксина. **Ключови думи** луминесценция, АТФ, CFU, БЦЖ, ваксина, метод

Г10. Sol – gel synthesis of silica - poly (vinylpyrrolidone) hybrids with prooxidant activity and antibacterial properties

Albena Bachvarova-Nedelcheva, Yoanna Kostova, Lilia Yordanova, Elena Nenova, Pavletta Shestakova, Iliana Ivanova, Elitsa Pavlova
Molecules, 2024, 29(11):2675
<https://doi.org/10.3390/molecules29112675>

Abstract The present work deals with the sol–gel synthesis of silica–poly (vinylpyrrolidone) hybrid materials. The nanohybrids (Si-PVP) have been prepared using an acidic catalyst at ambient temperature. Tetramethyl ortosilane (TMOS) was used as a silica precursor. Poly (vinylpyrrolidone) (PVP) was introduced into the reaction mixture as a solution in ethanol with a concentration of 20%. The XRD established that the as-prepared material is amorphous. The IR and ^{29}Si MAS NMR spectra proved the formation of a polymerized silica network as well as the hydrogen bonding interactions between the silica matrix and OH hydrogens of the silanol groups. The TEM showed spherical particle formation along with increased agglomeration tendency. The efficacy of SiO_2 /PVP nanoparticles as a potential antimicrobial agent against a wide range of bacteria was evaluated as bacteriostatic, using agar diffusion and spot tests. Combined effects of hybrid nanomaterial and antibiotics could significantly reduce the bactericidal concentrations of both the antibiotic and the particles, and they could also eliminate the antibiotic resistance of the pathogen. The registered prooxidant activity of the newly synthesized material was confirmative and explicatory for the antibacterial properties of the tested substance and its synergetic combination with antibiotics. The effect of new hybrid material on Crustacea *Daphnia magna* was also estimated as harmless under concentration of 0.1 mg/mL.

Keywords sol–gel, silica hybrids, antibacterial properties, ROS, prooxidant activity, *Daphnia magna*

Резюме Настоящата работа разглежда зол–гел синтез на хибридни материали от силициево–поли (винилпиролидон). Нанохибридите (Si-PVP) бяха приготвени с използване на киселинен катализатор при стайна температура. Тетраметил-ортосилан (TMOS) беше използван като силициев прекурсор. Поли (винилпиролидон) (PVP) беше добавен в реакционната смес като разтвор в етанол с концентрация 20%. Рентгеновата дифракция (XRD) установи, че полученият материал е аморфен. IR и ^{29}Si MAS NMR спектрите доказаха образуването на полимеризирана силициева мрежа, както и на водородни връзки, между силициевата матрица и ОН водородните атоми от силанолните групи. ТЕМ показва образуването на сферични частици, с повишена тенденция към агломерация. Ефективността на SiO_2 /PVP наночастиците като потенциален антимикробен агент срещу широк спектър от бактерии беше оценена като бактериостатична чрез дифузия в агар и спот тестове. Комбинираните ефекти на хибридният наноматериал и антибиотиците могат значително да намалят бактерицидните концентрации както на антибиотика, така и на частиците и също така да елиминират антибиотичната резистентност на патогена. Регистрираната прооксидантна активност на новосинтезияния материал потвърди и обясни антибактериалните свойства на тестваното вещество и неговата синергична комбинация с антибиотици.

Ефектът на новия хибриден материал върху ракообразното *Daphnia magna* също беше оценен като безвреден при концентрация от 0.1 mg/mL.

Ключови думи зол-гел, силициеви хибриди, антибактериални свойства, АФК, прооксидантна активност, *Daphnia magna*

Г11. Green synthesis, characterization and pharmaceutical applications of biocompatible zinc oxide nanoparticles using *Heliotropium rariflorum* stocks

Noor Ul Uza, Ghulam Dastagir, Syed Tanveer Shah, Elitsa L Pavlova, Aftab Jamal, Mahmoud F. Seleiman, Jakub Černý

Pharmaceuticals, 2024, 17(11):1457

<https://doi.org/10.3390/ph17111457>

Abstract Background: Zinc oxide nanoparticles are safe, non-toxic, and biocompatible. These NPs are used in food packaging materials, self-cleaning glass, ceramics, deodorants, sunscreens, paints, coatings, ointments, lotions, and as preservatives. This study explored the biological potential of ZnO nanoparticles synthesized using *H. rariflorum*. Methods: In vitro antibacterial and antifungal activities against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Candida albicans*, *Penicillium notatum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus solani* were determined. Antioxidant activity was explored using the DPPH radical scavenging method. In vivo analgesic, antipyretic and sedative potential of synthesized nanoparticles was investigated using a mouse model. Results: SEM with various magnification powers showed that some particles were spherical while some were aggregated, flake-shaped, and hexagonal with rough and irregular surfaces. The EDX analysis revealed Zn (12.63%), O (22.83%) and C (63.11%) with trace quantities of Si (0.40%), Ca (0.54%) and P (0.49%). The XRD pattern indicated an amorphous state, with no peaks observed throughout the spectrum. The UV–visible spectrophotometry revealed a characteristic absorption peak at 375 nm, indicating the presence of ZnO nanoparticles. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) displayed several small peaks between 1793 and 2370 cm⁻¹, providing evidence of the presence of different kinds of organic compounds with different functional groups. ZnO-NPs showed dose-dependent antibacterial and antifungal potential against all strains. *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* were the most susceptible strains. The nanoparticles exhibited a maximum antioxidant effect of 85.28% at 100 µg/mL. In this study, the acute toxicity test showed no mortality, and normal behavior was observed in mice at ZnO-NP doses of 5, 10, and 20 mg/kg. For analgesic and antipyretic activities, a two-way ANOVA revealed that dose, time, and the interaction between dose and time were significant. In contrast, the samples had a non-significant effect on sedative activity. Conclusions: This innovative study suggests a potential use of plant resources for managing microbes and treating various diseases, providing a scientific basis for the traditional use of *H. rariflorum*.

Keywords antibacterial; antifungal; antioxidant; acute toxicity; analgesic; antipyretic; sedative

Резюме Обосновка: Наночастиците от цинков оксид са безопасни, нетоксични и биосъвместими. Тези наночастици (NPs) се използват в опаковъчни материали за храни, самопочистващо се стъкло, керамика, дезодоранти, слънцезащитни кремове, бои, покрития, мехлеми, лосиони и като консерванти. Това проучване изследва биологичния потенциал на наночастици от ZnO, синтезирани с помощта на *H. rariflorum*. Методи: Определени бяха *in vitro* антибактериалните и противогъбичните активности срещу *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Candida albicans*, *Penicillium notatum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* и *Aspergillus solani*. Антиоксидантната

активност беше изследвана чрез метода за улавяне на DPPH радикали. *In vivo* аналгетичният, антипиретичният и седативният потенциал на синтезираните наночастици беше проучен с помощта на миши модел. Резултати: Сканиращата електронна микроскопия (SEM) при различни увеличения показва, че някои частици са сферични, докато други са агрегирани, люспести или хексагонални с грапава и неравномерна повърхност. Енергийно-дисперсионният рентгенов спектър (EDX) разкри съдържание на Zn (12,63%), O (22,83%) и C (63,11%) с малки количества Si (0,40%), Ca (0,54%) и P (0,49%). Рентгеновата дифракция (XRD) показва аморфно състояние без отчетливи пикове в спектъра. UV-видимата спектрофотометрия разкри характерен пик на абсорбция при 375 nm, което потвърждава наличието на наночастици от ZnO. Фурие-трансформираната инфрачервена спектроскопия (FTIR) показва няколко малки пика между 1793 и 2370 cm^{-1} , което е доказателство за наличието на различни органични съединения с различни функционални групи. ZnO-NPs показаха дозозависим антибактериален и противогъбичен потенциал срещу всички изследвани щамове. *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* бяха най-чувствителните щамове. Наночастиците проявиха максимален антиоксидантен ефект - 85,28% при концентрация от 100 $\mu\text{g/mL}$. В това проучване тестът за остра токсичност не показва смъртност, а при мишките се наблюдаваше нормално поведение при дози на ZnO-NP от 5, 10 и 20 mg/kg. Що се отнася до аналгетичната и антипиретичната активност, двупосочен ANOVA анализ разкри значително влияние на дозата, времето и взаимодействието между тях. За разлика от това, пробите не показаха значителен ефект върху седативната активност. Заключение: Това иновативно проучване предполага потенциално приложение на растителни ресурси за контрол на микроорганизми и лечение на различни заболявания, като предоставя научна основа за традиционната употреба на *H. rariflorum*.

Ключови думи антибактериално; противогъбично; антиоксидант; остра токсичност; аналгетик; антипиретик; успокоително

G12. Optical properties and antimicrobial activity of Si/PVP hybrid material combined with antibiotics

Lilia Yordanova, Yoanna Kostova, Elitsa Pavlova, Albena Bachvarova-Nedelcheva, Iliana Ivanova and Elena Nenova

Molecules, 2024, 29, 5322

<https://doi.org/10.3390/molecules29225322>

Abstract Silica–poly (vinylpyrrolidone) hybrid material was prepared using the sol–gel method. Tetramethyl ortosilane (TMOS) was used as a silica precursor. XRD analysis established that the as-prepared material is amorphous. The morphological structure of the final product was determined by the incorporated PVP. The UV–Vis analysis showed that the obtained hybrid exhibited absorption in the ultraviolet range. The antimicrobial activity of the $\text{SiO}_2/15\text{PVP}$ hybrid material was tested on *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Salmonella typhimurium* ATCC BAA-2162, *Candida albicans*, and *Saccharomyces cerevisiae* in combination with the following antibiotics: Vancomycin for Grampositive bacteria, Ciprofloxacin for Gram-negative bacteria, and Nystatin for yeast. The results confirmed a concentration-dependent synergistic effect of the antibiotic in combination with the TM15/PVP hybrid particles, especially at their highest concentration of 100 mg/mL on Gram-positive bacteria and for the Gram-negative Salmonella. On *Candida albicans* ATCC 18804 and *Saccharomyces cerevisiae* CCY 21-6-3, the effect was synergistic again, and a fungicidal effect was observed at 6.25 and 1.50 mg/mL for the antibiotic concentration and concentrations of hybrid material at 100 mg/mL. The toxicity on *Daphnia magna* was also tested. The registered prooxidant activity of $\text{SiO}_2/15\text{PVP}$ shows possible applications at very low concentrations. The obtained results demonstrate the possibility of clinical implementations of the newly synthesized hybrid material.

Keywords hybrid; optical properties; antibacterial properties; antibiotics; prooxidant properties; environmental toxicity control

Резюме Хибриден материал от силициево–поли(винилпиролон) беше синтезиран чрез зол-гел метод. Тетраметилортосилан (TMOS) беше използван като прекурсор на силициев диоксид. Рентгеновата дифракция (XRD) установи, че полученият материал е аморфен. Морфологичната структура на крайния продукт беше определена от включения PVP. UV-Vis анализът показва, че полученият хибрид абсорбира в ултравиолетовия диапазон. Антимикробната активност на хибридният материал SiO₂/15PVP беше тествана срещу *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Salmonella typhimurium* ATCC BAA-2162, *Candida albicans* и *Saccharomyces cerevisiae* в комбинация със следните антибиотици: ванкомицин за Грам-положителни бактерии, ципрофлоксацин за Грам-отрицателни бактерии и нистатин за дрожди. Резултатите потвърдиха концентрационно-зависим синергичен ефект на антибиотика в комбинация с хибридните частици TM15/PVP, особено при най-високата им концентрация от 100 mg/mL върху Грам-положителните бактерии и Грам-отрицателната *Salmonella*. При *Candida albicans* ATCC 18804 и *Saccharomyces cerevisiae* CCY 21-6-3 също се наблюдава синергичен ефект, а при концентрации на антибиотика от 6.25 и 1.50 mg/mL и на хибридният материал от 100 mg/mL се установи фунгициден ефект. Токсичността върху *Daphnia magna* също беше изследвана. Регистрираната прооксидантна активност на SiO₂/15PVP показва потенциални приложения при много ниски концентрации. Получените резултати демонстрират възможността за клинични приложения на новосинтезирания хибриден материал. Ключови думи хибрид; оптични свойства; антибактериални свойства; антибиотици; прооксидантни свойства; контрол на екологичната токсичност.

Г13. Antimicrobial and Oxidative Activities of Different Levels of Silver-Exchanged Zeolites X and ZSM-5 and Their Ecotoxicity

Elitsa L. Pavlova, Elena P. Nenova, Lyubomira D. Yocheva, Iliana A. Ivanova, and Peter A. Georgiev
Pharmaceuticals, 2024, 17(12):1586
<https://doi.org/10.3390/ph17121586>

Abstract Objectives: The antimicrobial, oxidative activities, and ecotoxicity of synthesized silverloaded zeolites (X and ZSM-5(MFI), Si-to-Al ratios 12 and 25) were studied, linking antimicrobial properties to material structure and released active silver species. Methods: The materials were characterized by SEM, EDX, TEM, and XRPD. All materials, with a silver content of 1–3%wt for the Ss and about 35%wt for the X-zeolites, were tested against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Redox activity was studied in physiological (pH 7.4/37 °C) and optimal (pH 8.5/37 °C) conditions in chemiluminescent model systems. In the ecotoxicity tests, we used *Daphnia magna*. Results: A proportional correlation was observed between the bactericidal effect of and the silver content in the zeolites. AgX with a Si/Al ratio of ~1.23 and 35% silver showed a higher antimicrobial efficiency, particularly against Gram-negative *E. coli* versus Gram-positive *S. aureus*. The concentration thresholds were as follows: AgXas had a bactericidal effect at 0.003 g/L⁻¹, with an MIC at 0.0015 m/L⁻¹ for *E. coli*; SA25-Ag, AgXcl, AgXrc had a bactericidal effect at 2.5 g/L⁻¹. The bacteria were more resilient than *Daphnia magna*, which showed a 90–100% lethality at Ag-zeolite concentrations of 0.00625 to 0.0125 g/L⁻¹. AgXas and AgXrc demonstrated strong reactive oxygen species generation at both the physiological and optimal pH, explaining their bactericidal effects. In general, the tested materials showed an inhibition of the generated reactive oxygen species depending on the model system and conditions. Conclusions: The silver species leached from the new materials explain their higher oxidation and bactericidal activity. While suitable for stringently controlled

biological applications, their release into the environment, in concentrations higher than 0.01g/L^{-1} , should be avoided.

Keywords Ag species; antimicrobial activity; ecotoxicity; luminescence; reactive oxygen species; zeolites

Резюме Цели: Изследвани бяха антимикробната активност, окислителните свойства и екоотоксичността на синтезирани сребърно-заредени зеолити (X и ZSM-5(MFI), със Si/Al съотношения 12 и 25), като беше направена връзка между антимикробните свойства, структурата на материала и отделените активни сребърни видове. Методи: Материалите бяха характеризирани чрез SEM, EDX, TEM и XRPD. Всички проби със съдържание на сребро от 1–3% мас. за Ss и около 35% мас. за X-зеолитите бяха тествани срещу *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Редокс активността беше изследвана във физиологични (pH 7.4/37 °C) и оптимални (pH 8.5/37 °C) условия в хемилуминесцентни моделни системи. Екоотоксичността беше анализирана с помощта на *Daphnia magna*. Резултати: Наблюдавана беше пропорционална зависимост между бактерицидния ефект и съдържанието на сребро в зеолитите. AgX със Si/Al съотношение ~ 1.23 и 35% съдържание на сребро показва по-висока антимикробна ефективност, особено срещу Грам-отрицателната *E. coli* в сравнение с Грам-положителния *S. aureus*. Установените концентрационни прагове бяха следните: AgXas проявява бактерициден ефект при 0.003 g/L^{-1} , с MIC (минимална инхибираща концентрация) от 0.0015 g/L^{-1} за *E. coli*; SA25-Ag, AgXcl и AgXrc показаха бактерициден ефект при 2.5 g/L^{-1} . Бактериите бяха по-устойчиви в сравнение с *Daphnia magna*, при която се наблюдаваше 90–100% смъртност при концентрации на Ag-зеолити от 0.00625 до 0.0125 g/L^{-1} . AgXas и AgXrc демонстрираха силно генериране на реактивни кислородни видове (ROS) както при физиологично, така и при оптимално pH, което обяснява техния бактерициден ефект. Като цяло, изследваните материали показаха потискане на генерираните ROS в зависимост от моделната система и условията. Заключение: Освобождаваните сребърни видове от новите материали обясняват тяхната засилена окислителна и бактерицидна активност. Въпреки че са подходящи за строго контролирани биологични приложения, освобождаването им в околната среда при концентрации над 0.01 g/L^{-1} трябва да се избягва.

Ключови думи сребърни видове; антимикробна активност; екоотоксичност; луминесценция; реактивни кислородни видове; зеолити.