Резюмета на рецензираните публикации
на доц. д-р Веселина Светославова Москова-Думанова,
за участие в конкурс за професор, обявен в ДВ 29/24.03.2026

B1. *R. Veleva, T. Topouzova-Hristova, A. Kostadinova, D. Benkova, A. Trendafilova, V. Ivanova, V. Moskova-Doumanova, K. Mladenova, J. Doumanov, G. Staneva,* **Flavonoid Glycosides and Phenolic Acids from Inula Oculus-Christi Modulate Membrane Organization and Provide Antioxidant Protection**, Molecules, 2025, doi:10.3390/molecules30132740
https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-105010262025&doi=10.3390%2fmolecules30132740&partnerID=40&md5=7e4d65451de4c14a058b462b113732f3
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:001527279300001

Abstract

Oxidative stress induces lipid peroxidation within the membrane bilayer, thereby compromising membrane integrity. Polyphenols (PPs), renowned for their antioxidant properties, have been shown to mitigate oxidative damage. Here, we investigated the structural and antioxidant effects of PPs—specifically flavonoid glycosides (FGs) and phenolic acids (PAs)—extracted from Inula oculus-christi using steady-state fluorescence spectroscopy in both model and cell membranes. Membrane lipid order was evaluated using DPH and Laurdan spectroscopy, while DPH-TEMPO fluorescence quenching was employed to quantify raft-like domain formation in model systems. The antioxidant capacity of the PP extracts was assessed via fluorescence quenching of cis-parinaric acid. Both FGs and PAs conferred approximately 2-fold antioxidant protection, with FGs showing a 1.13-fold greater effect than PAs. In addition, both PP classes promoted lipid raft formation, particularly in cholesterol-rich membranes. PPs increased order in the liquid-disordered (Ld) phase while inducing disorder in the liquid-ordered (Lo) phase, depending on the lipid-to-PP ratio. Notably, FGs enhanced membrane fluidity more strongly in A549 than in MDCKII cells, as reflected by a ~5.7-fold decrease in Laurdan GP in A549 (from 0.04 to −0.17) versus a ~1.4-fold decrease in MDCKII at 200 μg/mL. These findings highlight the dual structural and antioxidative roles of FGs and PAs in preserving membrane integrity under oxidative stress.

Резюме

Оксидативният стрес индуцира липидна пероксидация в мембранния бислой, като по този начин компрометира целостта на мембраната. Полифенолите (PP), известни със своите антиоксидантни свойства, са показали, че смекчават оксидативното увреждане. Тук изследвахме структурните и антиоксидантни ефекти на PP – по-специално флавоноидните гликозиди (FGs) и фенолните киселини (PAs) – екстрахирани от Inula oculus-christi, използвайки стационарна флуоресцентна спектроскопия както в моделни, така и в клетъчни мембрани. Подредеността на мембранните липиди беше оценена с помощта на DPH и Laurdan-ова спектроскопия, докато флуоресцентното гасене DPH-TEMPO беше използвано за количествено определяне на образуването на рафтоподобни домени в моделни системи. Антиоксидантният капацитет на PP от екстрактите беше оценен чрез флуоресцентно гасене на цис-паринарова киселина. Както FGs, така и PAs осигуряват приблизително 2-кратна антиоксидантна защита, като FGs показват 1,13 пъти по-голям ефект от PAs. Освен това, и двата класа PP насърчават образуването на липидни рафтове, особено в богати на холестерол мембрани. PPs увеличават подредбата в течно-неподредената (Ld) фаза, като същевременно индуцират разбъркване в течно-

подредената (Lo) фаза, в зависимост от съотношението липид-PP. Забележително е, че FGs повишават флуидността на мембраната по-силно в A549, отколкото в MDCKII клетки, което се отразява в ~5,7-кратно намаление на Laurdan GP в A549 (от 0,04 до -0,17) спрямо ~1,4-кратно намаление на MDCKII при 200 μg/mL. Тези открития подчертават двойната структурна и антиоксидантна роля на FGs и PAs за запазване на целостта на мембраната при оксидативен стрес.

B2. *R. Veleva, A. Kostadinova, A. Trendafilova, V. Ivanova, V. Moskova-Doumanova, K. Mladenova, J. Doumanov, D. Benkova, G. Staneva, T. Topouzova-Hristova, T.,* **Polyphenols from Inula oculus-christi L. Induced Cell-Specific Membrane and Cytoskeleton Reorganization.**, Membranes, vol:15, issue:12, 2025, pages:357-374,
doi: https://doi.org/10.3390/membranes15120357
https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-105025706037&doi=10.3390%2fmembranes15120357&partnerID=40&md5=4d83400f063e7d05a44911da173bdf1d
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:001646953600001

Abstract

Interrelations between the plasma membrane and cytoskeleton are of crucial importance for essential cellular processes such as endocytosis, formation of intercellular junctions, cell morphology, etc. Many studies validate the beneficial effects of polyphenols as antioxidant and protective agents, but a molecular mechanism of their interaction and transition through the plasma membranes of different cell lines is still missing. In this study, we examined the affinity of fractions enriched in flavonoid glycosides (FGs) and caffeoylquinic acids (CQAs), obtained from the methanol extract of the medicinal plant Inula oculus-christi L., to reorganize the plasma membrane structure and actin cytoskeleton by using confocal microscopy. Assessment of the degree of membrane ordering aiming to distinguish the ordered from disordered regions of the cellular membranes was performed using the fluorescent dye Di-4-ANEPPDHQ, and visualization of F-actin was by TRITC-phalloidin. Two epithelial cell lines with clear differences in their origin and plasma membrane organization were chosen: the non-malignant MDCK II and the cancerous A549. Our results showed that flavonoid glycosides exhibited an ordering effect on plasma membranes of cancerous cells and fluidized one on non-malignant cells. Different patterns of actin reorganization were observed for both cell lines after treatment. Our results indicate the potential of plantderived polyphenols as modulators of the membrane's structural organization, offering valuable insights for the development of membrane-targeted therapeutic strategies.

Резюме

Взаимоотношенията между плазмената мембрана и цитоскелета са от решаващо значение за основни клетъчни процеси като ендоцитоза, образуване на междуклетъчни връзки, клетъчна морфология и др. Много изследвания потвърждават благоприятните ефекти на полифенолите като антиоксидантни и защитни агенти, но молекулярният механизъм на тяхното взаимодействие и преминаване през плазмените мембрани на различни клетъчни линии все още липсва. В това проучване изследвахме афинитета на фракции, обогатени с флавоноидни гликозиди (FGs) и кафеоилхинови киселини (CQAs), получени от метаноловия екстракт на лечебното растение Inula oculus-christi L., за реорганизиране на структурата на плазмената мембрана и актиновия цитоскелет чрез конфокална микроскопия. Оценката на степента на мембранно подреждане с цел

разграничаване на подредените от нарушените области на клетъчните мембрани беше извършена с помощта на флуоресцентното багрило Di-4-ANEPPDHQ, а визуализацията на F-актин беше чрез TRITC-фалоидин. Избрани бяха две епителни клетъчни линии с ясни разлики в произхода и организацията на плазмената мембрана: нераковата MDCK II и раковата A549. Нашите резултати показват, че флавоноидните гликозиди проявяват подреждащ ефект върху плазмените мембрани на раковите клетки и флуидизиращ такъв върху нормалните клетки. Различни модели на реорганизация на актина бяха наблюдавани и за двете клетъчни линии след третиране. Нашите резултати показват потенциала на полифенолите, получени от растения, като модулатори на структурната организация на мембраната, предлагайки ценна информация за разработването на терапевтични стратегии, насочени към мембраната.

B3. *A. Trendafilova; P. Staleva, Z. Petkova; V. Ivanova, Y. Evstatieva, D. Nikolova, I. Rasheva, N. Atanasov, T. Topouzova-Hristova, R. Veleva, V. Moskova-Doumanova, V. Dimitrov; S. Simova*, **Phytochemical Profile, Antioxidant Potential, Antimicrobial Activity, and Cytotoxicity of Dry Extract from Rosa damascena Mill**, Molecules, vol:28, issue:22, 2023, pages:7666-0, ISSN (online):1420-3049, doi: https://doi.org/10.3390/molecules28227666
https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85177752892&doi=10.3390%2fmolecules28227666&partnerID=40&md5=9f3c9481c4c21d04e18a89fc8ad51d99
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:001114495500001

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. ^{1}H 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: Сухият екстракт от роза (DRE), получен индустриално чрез водно-етанолова екстракция от цветове на R. damascena, и неговата фенолно-обогатена фракция, получена чрез повторна екстракция с етилацетат (EAE), бяха предмет на това изследване. ^{1}H NMR на DRE позволи идентифицирането и количественото определяне на фруктоза и глюкоза, докато комбинираното използване на HPLC-DAD-ESIMS и HPLC-HRMS показа наличието на 14 кемпферолови гликозиди, 12 кверцетинови гликозиди, 4 фенолни киселини и техните естери, 4 галоилни гликозиди, 7 елагитанина и хининова киселина. В допълнение, структурите на 13 от флавоноидните гликозиди бяха допълнително потвърдени чрез NMR. Установено е, че EAE е по-богат на TPC и

TFC и показва по-добра антиоксидантна активност (DPPH, ABTS и FRAP) в сравнение с DRE. И двата екстракта показаха значителна активност срещу Propionibacterium acnes, Staphylococcus aureus и S. epidermidis, но не показаха активност срещу Candida albicans. Тестовете за токсичност върху нормални човешки кожни фибробласти показаха ниска токсичност и за двата екстракта с по-силни ефекти, наблюдавани на 24-ия час от третирането, които биваха компенсирани през следващите два дни. Човешките хепатокарциномни (HepG2) клетки показваха 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 лечението. По-ниските концентрации са нетоксични и не повлияват значително параметрите на клетъчния цикъл на нито една от клетъчните линии.

B4. *V. Moskova-Doumanova, A. Vaseva, R. Veleva, K. Mladenova, D. Melniska, J. Doumanov, P. Videv, T. Topouzova-Hristova, L. Dobreva, N. Atanasova and S. Danova,* **In Vitro Effects of Postmetabolites from Limosilactobacillus fermentum 53 on the Survival and Proliferation of HT-29 Cells**, Microorganisms, vol:12, 2024, ISSN (online):ISSN 2076-2607, https://doi.org/10.3390/microorganisms12071365
https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85199642339&doi=10.3390%2fmicroorganisms12071365&partnerID=40&md5=bc27c71790d4985bc542036c8e5517f6
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:001278549500001

Abstract: Naturally fermented dairy products are an important component of the human diet. They are a valuable source of nutrients as well as vitamins and minerals. Their importance as a source of probiotic bacterial strains should not be overlooked. A number of studies highlight the positive effects of species of the probiotic lactic acid bacteria on the intestinal microbiome and the overall homeostasis of the body, as well as a complementary treatment for some diseases. However, data on the effects on the intestinal epithelial cells of postmetabolites released by probiotic bacteria are incomplete. This is likely due to the fact that these effects are species- and strain-specific. In the present study, we investigated the effects of postmetabolites produced by a pre-selected candidate probiotic strain Limosilactobacillus fermentum on HT-29 intestinal epithelial cells. Our data showed a pronounced proliferative effect, evaluated by flow cytometry, quantification of the cell population and determination of the mitotic index. This was accompanied by the stabilization of the cell monolayer, measured by an increase in TEER (transepithelial electric resistance) and the reorganization of actin filaments. The data obtained are a clear indication of the positive effects that the products secreted by L. fermentum strain 53 have on intestinal epithelial cells.

Резюме: Натурално ферментиралите млечни продукти са важен компонент от човешката диета. Те са ценен източник на хранителни вещества, както и на витамини и минерали. Тяхното значение като източник на пробиотични бактериални щамове не бива да се пренебрегва. Редица проучвания подчертават положителните ефекти на видовете пробиотични млечнокисели бактерии върху чревния микробиом и цялостната хомеостаза на организма, както и като допълнително лечение за някои заболявания. Данните за ефектите върху чревните епителни клетки на постметаболитите, освободени от пробиотичните бактерии, обаче са непълни. Това вероятно се дължи на факта, че тези ефекти са за видово- и щамово-специфични. В настоящото проучване изследвахме ефектите на постметаболитите, произведени от предварително селектиран кандидат

пробиотичен щам *Limosilactobacillus fermentum*, върху чревно-епителни клетки от линията HT-29. Нашите данни показваха изразен пролиферативен ефект, оценен чрез флуоцитометрия, количествено определяне на клетъчната популация и определяне на митотичния индекс. Това бе съпроводено със стабилизиране на клетъчния монослой, измерено чрез повишаване на TEER (трансепително електрическо съпротивление) и реорганизация на актиновите филаменти. Получените данни са ясна индикация за положителните ефекти, които продуктите, секретирани от щам 53 на L. fermentum, оказват върху чревните епителни клетки.

B5. *A. Trendafilova, V. Ivanova, M. Rangelov, M. Todorova, G. Ozek, Ina. Aneva, R. Veleva, V. Moskova-Doumanova, J. Doumanov, T. Topouzova-Hristova,* **Caffeoylquinic Acids, Cytotoxic, Antioxidant, Acetylcholinesterase and Tyrosinase Enzyme Inhibitory Activities of Six Inula Species from Bulgaria**, Chem. Biodiversity, 2020, doi:10.1002/cbdv.202000051
https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85081946242&doi=10.1002%2fcbdv.202000051&partnerID=40&md5=d94fa1f08352ad85df372af2bfe316ed
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000520280700001

Abstract

Chlorogenic (5-CQA), 1,5-, 3,5-, 4,5- and 3,4-dicaffeoylquinic (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. conyza* (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 в метанолови 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 хлорогенни (5-CQA), 1,5-, 3,5-, 4,5- и 3,4-дикафеоилхинови (DCQA) киселини. Количеството на 5-CQA вариране от 5,48 до 28,44 mg/g DE, като най-високото съдържание беше открито в I. ensifolia. 1,5-DCQA (4,05–55,25 mg/g DE) беше най-разпространеният дикафеоил естер на хиновата киселина, следван от 3,5-DCQA, 4,5-DCQA и 3,4-DCQA. Екстрактът от I. ensifolia показа най-високо общо фенолно съдържание (119,92 ± 0,95 mg GAE/g DE) и проявяваше най-силна активност за улавяне на DPPH радикали (69,41 ± 0,55%). Екстрактът от I. bifrons се оказа най-активната проба срещу ABTS*+ (TEAC 0,257 ± 0,012 mg/mL) и най-добрият инхибитор на тирозиназата. Изследваните екстракти демонстрираха нисък инхибиторен ефект спрямо ацетилхолинестеразата и притежаваха ниска цитотоксичност в концентрационен диапазон от 10 до 300 μg/mL спрямо неракови (MDCK II) и ракови (A 549) клетки.

Г1. *P. Bakardzhiev, T. Koleva, K. Mladenova, P. Videv, V. Moskova-Doumanova, A. Forys, S. Pusz, T. Andreeva, S. Petrova, S. Rangelov, J. Doumanov,* **Design and Biological Evaluation of hBest1-Containing Bilayer Nanostructures**, Molecules, vol:30, 2948, 2025, doi:https://doi.org/10.3390/molecules30142948
https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-105011646797&doi=10.3390%2fmolecules30142948&partnerID=40&md5=95390ee3eae3013f9d93d37d6c6178c6
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:001553382000001

Abstract

Bestrophinopathies are a group of inherited retinal diseases caused by mutations in the BEST1 gene. The protein encoded by this gene, bestorphin-1 (hBest1), is a calciumdependent transmembrane channel localized on the basolateral membrane of retinal pigment epithelial (RPE) cells. We have already demonstrated the surface behavior and organization of recombinant hBest1 and its interactions with membrane lipids such as 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC), sphingomyelin (SM) and cholesterol (Chol) in models of biological membranes, which affect the hBest1 structure–function relationship.

The main aim of our current investigation is to integrate pure hBest1 protein into lipid bilayer nanostructures. We synthesized and characterized various hBest1-containing nanostructures based on 1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), SM, glycerol monooleate (GMO) and Chol in different ratios and determined their cytotoxicity and incorporation into cell membranes and/or cells by immunofluorescence staining. Our results show that these newly designed nanoparticles are not cytotoxic and that their incorporation into MDCK II cell membranes (used as a model system) may provide a mechanism that could be applied to RPE cells expressing mutated hBest1 in order to restore their ion transport functions, affected by mutated and malfunctioning hBest1 molecules.

Резюме

Бестрофинопатиите са група от наследствени заболявания на ретината, причинени от мутации в гена *BEST1*. Протеинът, кодиран от този ген, бесторфин-1 (hBest1), е калций-зависим трансмембранен канал, локализиран върху базолатералната мембрана на клетките на пигментния епител (RPE) на ретината. Вече демонстрирахме повърхностното поведение и организация на рекомбинантния hBest1 и неговите взаимодействия с мембранни липиди като 1-палмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (POPC), сфингомиелин (SM) и холестерол (Chol) в модели на биологични мембрани, които влияят на връзката структура-функция на hBest1.

Основната цел на настоящото ни изследване бе да интегрираме чист hBest1 протеин в липидни двуслойни наноструктури. Синтезирахме и характеризирахме различни hBest1-съдържащи наноструктури, базирани на 1,2-дипалмитоилфосфатидилхолин (DPPC), SM, глицерол моноолеат (GMO) и Chol в различни съотношения и определихме тяхната цитотоксичност и включване в клетъчните мембрани и/или клетки чрез имунофлуоресцентно оцветяване. Нашите резултати показват, че тези новоразработени наночастици не са цитотоксични и че включването им в клетъчните мембрани на MDCK II (използвани като моделна система) може да осигури механизъм, който би могъл да се приложи към RPE клетки, експресиращи мутирал hBest1, за да се възстановят техните функции за йонен транспорт, засегнати от мутирали и неправилно функциониращи hBest1 молекули.

***Г2**. P. Videv, K. Mladenova, T. Andreeva, N. Mladenov, V. Moskova-Doumanova, S. Petrova, J. Doumanov,* **Surface behavior of ternary hBest1/lipids Langmuir monolayers**, FEBS Open Bio, volume 13, 2023, pages:181-181, doi:https://doi.org/10.1002/2211-5463.13646
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:001401044000523

Abstract

Human bestrophin-1 (hBest1) is a transmembrane Ca2+-activated Cl– channel, expressed in retinal pigment epithelium and neuroglia. Mutations of BEST1 gene cause retinal degenerative diseases defined as 'bestrophinopathies'. hBest1 can transfer other anions and neuromediators, such as glutamate and γ-aminobutyrate, affecting pathological conditions as Parkinson's and Alzheimer's disease. Here, we analyze Langmuir monolayers consisting of hBest1 and cholesterol, phosphatidylcholine (POPC) and sphingomyelin (SM), as some of the most abundant lipids in the cell membranes. By examining the π/A isotherms and adapting the Goodrich method for three-component monolayers we showed that the effect of cholesterol on the miscibility of the protein in ternary films is significant. Cholesterol enhances mixing and stability in hBest1/POPC/Chol films by reducing phase separation between hBest1 and POPC, while in hBest1/SM/Chol films miscibility is maintained (Previously published in: Videv P. et al. (2022) Molecules 27(13):4267). Addition of Ca^{2+} was found to induce the condensing and stabilizing effect on both ternary monolayers, despite their different phase state.

Резюме

Човешкият бестрофин-1 (hBest1) е трансмембранен Ca2+-активиран Cl– канал, експресиран в пигментния епител на ретината и невроглията. Мутациите в гена *BEST1* причиняват дегенеративни заболявания на ретината, означавани като „бестрофинопатии". hBest1 може да пренася други аниони и невромедиатори, като глутамат и γ-аминобутират, имайки отношение към патологични състояния като болестта на Паркинсон и Алцхаймер. Анализирахме Лангмюерови монослоеве, състоящи се от hBest1 и холестерол, фосфатидилхолин (POPC) и сфингомиелин (SM), като едни от най-разпространените липиди в клетъчните мембрани. Чрез изследване на π/A изотермите и адаптиране на метода на Гудрич за трикомпонентни монослоеве, показахме, че ефектът на холестерола върху смесваемостта на белтъка в тройните филми е значителен. Холестеролът подобрява смесването и стабилността в hBest1/POPC/Chol филмите чрез намаляване на фазовото разделяне между hBest1 и POPC, докато в hBest1/SM/Chol филмите смесваемостта се запазва (Публикувано преди това в: Videv P. et al. (2022) Molecules 27(13):4267). Установихме е, че добавянето на Ca^{2+} индуцира кондензиращия и стабилизиращ ефект и върху двата тройни монослоя, въпреки различното им фазово състояние.

***Г3**. J. A. Doumanov, K. Mladenova, V. Moskova-Doumanova, T. D. Andreeva, S. D. Petrova,* **Self-organization and surface properties of hBest1 in models of biological membranes**, Advances in Colloid and Interface Science, vol:302, issue:102619, 2022, doi:https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102619
https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85125698231&doi=10.1016%2fj.cis.2022.102619&partnerID=40&md5=2cd676491952bbf3e5bf64c40de63822
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000788251700001

Abstract

The transmembrane Ca^{2+} - activated Cl^- channel - human bestrophin-1 (hBest1) is expressed in retinal pigment epithelium and mutations of *BEST1* gene cause ocular degenerative diseases colectivelly referred to as "bestrophinopathies". A large number of genetical, biochemical, biophysical and molecular biological studies have been performed to understand the relationship between structure and function of the hBest1 protein and its pathophysiological significance. Here, we review the current understanding of hBest1 surface organization, interactions with membrane lipids in model membranes, and its association with microdomains of cellular membranes. These highlights are significant for modulation of channel activity in cells.

Резюме

Трансмембранният Ca^{2+} - активиран Cl^- канал - човешкият бестрофин-1 (hBest1) се експресира в пигментния епител на ретината, а мутациите в гена *BEST1* причиняват очни дегенеративни заболявания, общо наричани „бестрофинопатии". Проведени са голям брой генетични, биохимични, биофизични и молекулярно-биологични изследвания, за да се разбере връзката между структурата и функцията на протеина hBest1 и неговото патофизиологично значение. Тук разглеждаме текущото разбиране за повърхностната организация на hBest1, взаимодействията с мембранните липиди в моделни мембрани и неговата връзка с микродомейните на клетъчните мембрани. Тези акценти са важни за модулирането на активността на каналите в клетките.

Г4. *P. Videv, K. Mladenova, T. D. Andreeva, J. H. Park, V. Moskova-Doumanova, S. D. Petrova, J. A. Doumanov,* **Cholesterol Alters the Phase Separation in Model Membranes Containing hBest1**, Molecules , vol:27, issue:13, 4267, 2022, doi: https://doi.org/10.3390/molecules27134267
https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85133432508&doi=10.3390%2fmolecules27134267&partnerID=40&md5=dd0525342196ca45a72904091b61d25e
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000825702300001

Abstract

Human retinal pigment epithelial (RPE) cells express the transmembrane Ca^{2+}-dependent Cl^- channel bestrophin-1 (hBest1) of the plasma membrane. Mutations in the hBest1 protein are associated with the development of distinct pathological conditions known as bestrophinopathies. The interactions between hBest1 and plasma membrane lipids (cholesterol (Chol), 1-palmitoyl-2-oleoylsn-glycero-3-phosphocholine (POPC) and sphingomyelin (SM)) determine its lateral organization and surface dynamics, i.e., their miscibility or phase separation. Using the surface pressure/mean molecular area (π/A) isotherms, hysteresis and compressibility moduli (Cs^{-1}) of hBest1/POPC/Chol and hBest1/SM/Chol composite Langmuir monolayers, we established that the films are in an LE (liquid-expanded) or LE-LC (liquid-condensed) state, the components are well-mixed and the Ca^{2+} ions have a condensing effect on the surface molecular organization. Cholesterol causes a decrease in the elasticity of both films and a decrease in the ΔG_{mix}^{π} values (reduction of phase separation) of hBest1/POPC/Chol films. For the hBest1/SM/Chol monolayers, the negative values of ΔG_{mix}^{π} are retained and equalized with the values of ΔG_{mix}^{π} in the hBest1/POPC/Chol films. Shifts in phase separation/miscibility by cholesterol can lead to changes in the structure and localization of hBest1 in the lipid rafts and its channel functions.

Резюме

Клетки на човешкия ретинален пигментен епител (RPE) експресират трансмембранния Ca^{2+}-зависим Cl^-канал бестрофин-1 (hBest1) на плазмената мембрана. Мутациите в белтъка hBest1 са свързани с развитието на различни патологични състояния, известни като бестрофинопатии. Взаимодействията между hBest1 и липидите на плазмената мембрана (холестерол (Chol), 1-палмитоил-2-олеоил-глицеро-3-фосфохолин (POPC) и сфингомиелин (SM)) определят латералната организация и повърхностна динамика, т.е. тяхната смесваемост или фазово разделяне. Използвайки изотермите на повърхностно налягане/средна площ за молекула (π/A), хистерезиса и модулите на свиваемост (C_s^{-1}) на композитните Лангмюерови монослоеве от hBest1/POPC/Chol и hBest1/SM/Chol, установихме, че филмите са в LE (течно разширено) или LE-LC (течно кондензирано) състояние, компонентите са добре смесени и Ca^{2+} йони имат кондензиращ ефект върху повърхностната молекулярна организация. Холестеролът причинява намаляване на еластичността на двата филма и намаляване на стойностите на ΔG_{mix}^{π} (намаляване на фазовото разделяне) на филмите от hBest1/POPC/Chol. За монослоевете hBest1/SM/Chol отрицателните стойности на ΔG_{mix}^{π} се запазват и се изравняват със стойностите на ΔG_{mix}^{π} във филмите от hBest1/POPC/Chol. Промените във фазовото разделяне/смесваемост от холестерола могат да доведат до промени в структурата и локализацията на hBest1 в липидните рафтове и неговите канални функции.

Г5. *P. Videv, N. Mladenov, T. Andreeva, K. Mladenova, V. Moskova- Doumanova, G. Nikolaev, S. D. Petrova, J. A. Doumanov*, **Condensing Effect of Cholesterol on hBest1/POPC and hBest1/SM Langmuir Monolayers**, Membranes, vol:11, issue:1, 52, 2021, doi:https://doi.org/10.3390/membranes11010052
https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85100324220&doi=10.3390%2fmembranes11010052&partnerID=40&md5=401fb8aa66cc389b6a36a1417c68886a
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000610380700001

Abstract

Human bestrophin-1 protein (hBest1) is a transmembrane channel associated with the calcium-dependent transport of chloride ions in the retinal pigment epithelium as well as with the transport of glutamate and GABA in nerve cells. Interactions between hBest1, sphingomyelins, phosphatidylcholines and cholesterol are crucial for hBest1 association with cell membrane domains and its biological functions. As cholesterol plays a key role in the formation of lipid rafts, motional ordering of lipids and modeling/remodeling of the lateral membrane structure, we examined the effect of different cholesterol concentrations on the surface tension of hBest1/POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) and hBest1/SM Langmuir monolayers in the presence/absence of Ca^{2+} ions using surface pressure measurements and Brewster angle microscopy studies. Here, we report that cholesterol: (1) has negligible condensing effect on pure hBest1 monolayers detected mainly in the presence of Ca^{2+} ions, and; (2) induces a condensing effect on composite hBest1/POPC and hBest1/SM monolayers. These results offer evidence for the significance of intermolecular protein–lipid interactions for the conformational dynamics of hBest1 and its biological functions as multimeric ion channel.

Резюме

Човешкият протеин бестрофин-1 (hBest1) е трансмембранен канал, свързан с калций-зависимия транспорт на хлоридни йони в пигментния епител на ретината, както

и с транспорта на глутамат и GABA в нервните клетки. Взаимодействията между hBest1, сфингомиелини, фосфатидилхолини и холестерол са от решаващо значение за асоциацията на hBest1 с клетъчната мембрана и нейните биологични функции. Тъй като холестеролът играе ключова роля във формирането на липидни рафтове, подреждането на липидите и моделирането/ремоделирането на латералната структура на мембрана, ние изследвахме ефекта на различни концентрации на холестерол върху повърхностното напрежение на hBest1/POPC (1-палмитоил-2- олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин) и hBest1/SM Лангмюерови монослоеве в присъствието/отсъствието на Ca^{2+} йони, използвайки измервания на повърхностно налягане и изследвания с микроскопия под ъгъл на Брюстер. Тук ние съобщаваме, че холестеролът: (1) има незначителен кондензиращ ефект върху чисти hBest1 монослоеве, главно в присъствието на Ca^{2+} йони, и; (2) индуцира кондензиращ ефект върху композитните монослоеве от hBest1/POPC и hBest1/SM. Тези резултати предлагат доказателства за значението на междумолекулните протеин-липидни взаимодействия за конформационната динамика на hBest1 и неговите биологични функции като мултимерен йонен канал.

Г6. *N. Mladenov, S. Petrova, T. Andreeva, V. Moskova-Doumanova, P. Videv, K. Mladenova, J. Doumanov,* **Effect of cholesterol on mixed hBest1/lipid monolayers**, FEBS OPEN BIO, vol:11, issue: Suppl. 1, 2021, pages: 224-224, doi:https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/2211-5463.13205 *https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000668898601061*

Abstract

Human bestrophin-1 (hBest1) is a calcium dependent chloride channel, expressed at the basolateral membrane domain of retinal pigment epithelium. Mutations in *hBEST1* gene are linked to a group of pathologies referred as Bestrophinopathies. A new biological role for hBest1 has been proposed related to the neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's. As a transmembrane protein, hBest1 functional activity is strongly dependent of its lipid environment. Here, we present the effect of cholesterol on mixed two-component protein-lipid monolayers: hBest1/1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) and hBest1/sphingomyelin (SM) (in the presence of Ca^{2+} ions). Using physicochemical experiments (Previously published in: Videv P et al. (2021) Membranes 11 art. no. 52, pp. 1–8) based on the surface pressure/mean molecular area (π/A) isotherms as a function of cholesterol concentration, we showed that under the given conditions (35°C, close to physiological), cholesterol exerts condensing effect on mixed hBest1/POPC and hBest1/SM monolayers. π/A isotherms are shifted to a higher surface pressure at a given molecular area, and to a lower molecular area at a given π (Aπ). This surface behavior of cholesterol is associated with its structuring properties on membranes and association of hBest1 with enriched cholesterol microdomains.

Резюме

Човешкият бестрофин-1 (hBest1) е калций-зависим хлорен канал, експресиран в базолатералния мембранен домен на ретиналния пигментен епител. Мутациите в гена *hBEST1* са свързани с група патологии, наричани бестрофинопатии. Предложена е нова биологична роля за hBest1, свързана с невродегенеративни заболявания като болестта на Алцхаймер и Паркинсон. Като трансмембранен белтък, функционалната активност на hBest1 е силно зависима от неговата липидна среда. Тук представяме ефекта на холестерола върху смесени двукомпонентни белтък-липидни монослоеве: hBest1/1-палмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (POPC) и hBest1/сфингомиелин (SM) (в

присъствието на Ca^{2+} йони). Използвайки физикохимични експерименти (публикувани преди това в: Videv P et al. (2021) Membranes 11 art. no. 52, pp. 1–8), базирани на изотермите на повърхностното налягане/средната молекулна площ (π/A) като функция на концентрацията на холестерол, ние показахме, че при дадените условия (35°C, близки до физиологичните), холестеролът упражнява кондензиращ ефект върху смесени монослоеве hBest1/POPC и hBest1/SM. π/A изотермите са изместени към по-високо повърхностно налягане при дадена молекулна площ и към по-ниска молекулна площ при дадено π (Aπ). Това повърхностно поведение на холестерола е свързано с неговите структуриращи свойства върху мембраните и асоциацията на hBest1 с обогатени на холестерол микродомени.

Г7. *N. Mladenov, S. Petrova, K. Mladenova, D. Bozhinova, V. Moskova-Doumanova, T. Topouzova-Hristova, P. Videv, R. Veleva, T. Andreeva, J. Doumanov,* **Miscibility of hBest1 and sphingomyelin in surface films - A prerequisite for interaction with membrane domains**, Colloids Surf B Biointerfaces, vol:189, 2020, doi:10.1016/j.colsurfb.2020.110893
https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85079888303&doi=10.1016%2fj.colsurfb.2020.110893&partnerID=40&md5=b99014eb0f9c56bc49baac717f91f79e
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000527314700055

Abstract

Human bestrophin-1 (hBest1) is a transmembrane Ca^{2+}- dependent anion channel, associated with the transport of Cl^-, HCO_3^- ions, γ-aminobutiric acid (GABA), glutamate (Glu), and regulation of retinal homeostasis. Its mutant forms cause retinal degenerative diseases, defined as Bestrophinopathies. Using both physicochemical - surface pressure/mean molecular area (π/A) isotherms, hysteresis, compressibility moduli of hBest1/sphingomyelin (SM) monolayers, Brewster angle microscopy (BAM) studies, and biological approaches – detergent membrane fractionation, Laurdan (6-dodecanoyl-N,N-dimethyl-2-naphthylamine) and immunofluorescence staining of stably transfected MDCK-hBest1 and MDCK II cells, we report: 1) Ca^{2+}, Glu and GABA interact with binary hBest1/SM monolayers at 35 °C, resulting in changes in hBest1 surface conformation, structure, self-organization and surface dynamics. The process of mixing in hBest1/SM monolayers is spontaneous and the effect of protein on binary films was defined as "fluidizing", hindering the phase-transition of monolayer from liquid-expanded to intermediate (LE-M) state; 2) in stably transfected MDCK-hBest1 cells, bestrophin-1 was distributed between detergent resistant (DRM) and detergent-soluble membranes (DSM) - up to 30 % and 70 %, respectively; in alive cells, hBest1 was visualized in both liquid-ordered (Lo) and liquid-disordered (Ld) fractions, quantifying protein association up to 35% and 65 % with Lo and Ld. Our results indicate that the spontaneous miscibility of hBest1 and SM is a prerequisite to diverse protein interactions with membrane domains, different structural conformations and biological functions.

Резюме

Човешкият бестрофин-1 (hBest1) е трансмембранен Ca^{2+}-зависим анионен канал, свързан с транспорта на Cl^-, HCO_3^- йони, γ-аминобутирова киселина (GABA), глутамат (Glu) и регулирането на хомеостазата на ретината. Мутантните му форми причиняват дегенеративни заболявания на ретината, определяни като бестрофинопатии. Използвайки както физикохимични - изотерми на повърхностно налягане/средна молекулна площ (π/A), хистерезис, модули на свиваемост на hBest1/сфингомиелинови

(SM) монослоеве, изследвания с Brewster ъглова микроскопия (BAM), така и биологични подходи - детергентно фракциониране на мембрана, оцветяване с Laurdan (6-додеканоил-N,N-диметил-2-нафтиламин) и имунофлуоресцентно оцветяване на стабилно трансфектирани MDCK-hBest1 и MDCK II клетки, ние докладваме че: 1) Ca^{2+}, Glu и GABA взаимодействат с бинарни hBest1/SM монослоеве при 35 °C, което води до промени в повърхностната конформация, структура, самоорганизация и повърхностна динамика на hBest1. Процесът на смесване в hBest1/SM монослоевете е спонтанен и ефектът на протеина върху бинарните филми е определен като „флуидизиране“, възпрепятствайки фазовия преход на монослоя от течно-разширено към междинно (LE-M) състояние; 2) в стабилно трансфектирани MDCK-hBest1 клетки, бестрофин-1 е разпределен между резистентни към детергенти (DRM) и разтворими в детергенти (DSM) мембрани - съответно до 30% и 70%; в живи клетки, hBest1 се визуализира както в течно-подредени (Lo), така и в течно-неподредени (Ld) фракции, като количествено определената асоциация на протеините е до 35% и 65% с Lo и Ld, съответно. Нашите резултати показват, че спонтанната смесваемост на hBest1 и SM е предпоставка за разнообразни протеинови взаимодействия с мембранни домени, различни структурни конформации и биологични функции.

Г8. *T.D. Andreeva, S.D. Petrova, K. Mladenova, V. Moskova-Doumanova, T. Topouzova-Hristova, N. Mladenov, K. Balashev, Z. Lalchev, J. Doumanov*, **Effects of Ca2+, Glu and GABA on hBest1 and composite hBest1/POPC surface films.**, Colloid and surfaces B: Biointerfaces, issue:161, 2018, pages:192-199, ISSN (print):0927-7765, ISSN (online):1873-4367, https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.10.051
https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85032228805&doi=10.1016%2fj.colsurfb.2017.10.051&partnerID=40&md5=1ef539a3c72b5e1ab1d37ae1c2f5f7e3
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000423636100024

Abstract

Bestrophinopathies are ocular diseases caused by mutations in the human bestrophin-1 (hBest1) – transmembrane Ca^{2+}-activated chloride channel protein, mainly expressed in the retinal pigment epithelium (RPE) cells. hBest1 is also an important transporter for neurotransmitters such as glutamate (Glu) and γ-aminobutyric acid (GABA) in the nervous system. Recently, a new biological role of hBest1, related to its possible involvement in the pathology of brain diseases (Alzheimer's, Parkinson's disease) has been proposed. Here, we report the effects of Ca^{2+}, Glu and GABA on hBest1 and composite hBest1/POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) Langmuir and Langmuir-Blodgett monolayers based on surface dynamics (π/A isotherms, hysteresis and compressibility), morphology (Brewster angle microscopy, BAM) and visualization of protein molecular organization (Atomic force microscopy, AFM). Ca^{2+} ions and neurotransmitters Glu and GABA affect hBest1 topology at the air/water interface altering its surface activity, size, orientation and organization. In contrast, no significant changes were detected on π/A isotherms and hysteresis of the composite hBest1/POPC films but their effects on structure, aggregation state and orientation hBest1 established by BAM and AFM differentiate. We found that the binary films of hBest1 and POPC are phase separated at the air/water interface, suggesting stronger lipid-lipid and protein-protein interactions than lipid-protein interactions that can significantly alter the molecular organization and activity of hBest1 in cell membranes. Our data shed light on structure, surface

behavior and organization of hBest1 that define relationship structure-functional activity of hBest1 as transport channel.

Резюме

Бестрофинопатиите са очни заболявания, причинени от мутации в човешкия бестрофин-1 (hBest1) – трансмембранен Ca^{2+}-активиран хлорен канален протеин, експресиран главно в клетките на пигментния епител на ретината (RPE). hBest1 е също важен транспортер за невротрансмитери като глутамат (Glu) и γ -аминомаслена киселина (GABA) в нервната система. Наскоро беше предложена нова биологична роля на hBest1, свързана с възможното му участие в патологията на мозъчни заболявания (болест на Алцхаймер, болест на Паркинсон). Тук докладваме ефектите на Ca^{2+}, Glu и GABA върху hBest1 и композитните hBest1/POPC (1-палмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин) Лангмюерови и Лангмюер-Блоджетови монослоеве, базирани на повърхностна динамика (π/A изотерми, хистерезис и свиваемост), морфологията (ъглова микроскопия на Брюстър, BAM) и визуализацията на молекулярната организация на протеините (атомно-силова микроскопия, AFM). Ca^{2+} йони и невротрансмитерите Glu и GABA влияят върху топологията на hBest1 на границата въздух/вода, променяйки неговата повърхностна активност, размер, ориентация и организация. За разлика от това, не установихме значителни промени в π/A изотермите и хистерезиса на композитните hBest1/POPC филми, но техните ефекти върху структурата, агрегационното състояние и ориентацията на hBest1, установени чрез BAM и AFM, се различават. Установихме, че бинарните филми на hBest1 и POPC са фазово разделени на границата въздух/вода, което предполага по-силни липид-липидни и протеин-протеинови взаимодействия, отколкото липид-протеинови взаимодействия, които могат значително да променят молекулярната организация и активността на hBest1 в клетъчните мембрани. Нашите данни хвърлят светлина върху структурата, повърхностното поведение и организацията на hBest1, които определят връзката структура-функционална активност на hBest1 като транспортен канал.

Г9. *K. Mladenova, S.Petrova, T. Andreeva, V. Moskova-Doumanova, Z. Lalchev, J. Doumanov,* **Effect of Ca2+ ions on Bestrophin-1 interaction with 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine in surface films**, FEBS Journal, vol:282, issue:S1, 2015, pages:319-320, ISSN (print):1742-464X, ISSN (online):1742-4658 *https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000362570606020*

Abstract

Bestrophin-1 (Best1) is a transmembrane multifunctional protein, expressed in the plasma membrane of retinal pigment epithelium. Best1 may acts as Ca^{2+} activated chloride channel or/and regulator of voltage-gated Ca^{2+} channels. Its interactions with the plasma membrane lipids are important for the conformation, oligomerization and functional activity. Studies in this field have not been performed so far as the protein was not purified to homogeneity. Our group published an original methodology for isolation and purification of sufficient quantities of functionally active human recombinant Best1 from stably transfected MDCK cells.

Our interest has been focused on the effect of Ca^{2+} ions on Best1 interactions with 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) in Langmuir monolayers since it is the most abundant phospholipid of animal cell membranes.

The π/A (surface pressure/area) isotherms and compression/expansion isocycles of Best1, POPC and Best1/POPC monolayers were recorded in absence and presence of Ca^{2+} in

the subphase. The effect of Ca^{2+} on the morphology of monolayers was observed by Brewster angle microscopy (BAM).

Our study shows that the incorporation of Ca^{2+} in the subphase does not change the shape of π/A isotherms but decrease the mean molecular area of Best1, POPC and Best1/POPC monolayers. These results correlate well with BAM images representing that the presence of Ca^{2+} induces the formation of lipid/protein macromolecular aggregates (Best1/POPC clusters) during monolayers compression. We assume that Ca^{2+} ions play role for interaction of Best1 with POPC at physiological conditions in the cell.

Резюме

Бестрофин-1 (Best1) е трансмембранен мултифункционален протеин, експресиран в плазмената мембрана на пигментния епител на ретината. Best1 може да действа като Ca^{2+} активиран хлорен канал или/и регулатор на потенциал-зависими Ca^{2+} канали. Неговите взаимодействия с липидите на плазмената мембрана са важни за конформацията, олигомеризацията и функционалната му активност. Досега не са провеждани изследвания в тази област, тъй като протеинът не е бил пречистен до хомогенност. Нашата група публикува оригинална методология за изолиране и пречистване на достатъчни количества функционално активен човешки рекомбинантен Best1 от стабилно трансфектирани MDCK клетки.

Нашият интерес е фокусиран върху ефекта на Ca^{2+} йони върху взаимодействията на Best1 с 1-палмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (POPC) в Лангмюерови монослоеве, тъй като това е най-разпространеният фосфолипид в мембраните на животинските клетки.

Изотермите π/A (повърхностно налягане/площ) и изоциклите компресия/разширение на монослоевете Best1, POPC и Best1/POPC бяха регистрирани при отсъствие и присъствие на Ca^{2+} в субфазата. Ефектът на Ca^{2+} върху морфологията на монослоевете беше наблюдаван чрез ъглова микроскопия на Брюстър (BAM).

Нашето проучване показва, че включването на Ca2+ в субфазата не променя формата на π/A изотермите, но намалява средната площ за молекула на монослоевете Best1, POPC и Best1/POPC. Тези резултати корелират добре с BAM изображенията, показващи, че наличието на Ca^{2+} индуцира образуването на макромолекулни агрегати от липиди/протеини (клъстери Best1/POPC) по време на компресията на монослоевете. Предполагаме, че Ca^{2+} йоните играят роля за взаимодействието на Best1 с POPC при физиологични условия в клетката.

Г10*. K. Mladenova, S. Petrova, G. Georgiev, V. Moskova-Doumanova, Z. Lalchev, J. Doumanov,* **Interaction of Bestrophin-1 with 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) in surface films**, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, том:122, 2014, стр.:432-438, ISSN (print):0927-7765, ISSN (online):1873-4367, doi:10.1016/j.colsurfb.2014.01.045
https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84910034787&doi=10.1016%2fj.colsurfb.2014.01.045&partnerID=40&md5=8d58c74e88a35999dc4ba6590d5d3055
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000343612900054

Abstract

Human bestrophin-1 (hBest1) is a transmembrane channel protein, predominantly expressed in the membrane of retinal pigment epithelium (RPE) cells. Although it is clear that hBest1's interactions with lipids are crucial for its function such studies were not performed as

the protein was not purified. Here we describe an effective purification of hBest1 from Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells via simple gel-filtration and affinity chromatographic steps, which makes possible to probe the protein interplay with lipids. The interaction of the purified hBest1 with 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(POPC) was studied in Langmuir monolayers. The surface pressure (π)–area (A) isotherms and compression/expansion isocycles of POPC monolayer were recorded in absence and presence of hBest1 in the subphase. The π(A) isotherms were analyzed in terms of surface compressional modulus and via two-dimensional virial equation of state. The dilatational rheological properties of the surface films and their surface potential were also measured. The morphology of the films was observed by Brewster angle microscopy. The inclusion of the protein in the film subphase does not lead to in-depth penetration ofhBest1 but interaction takes place in the headgroup region of the monolayer. The hBest1/POPC interaction resulted in formation of more condensed films, which rheological properties and lateral structure differed significantly from the pure POPC monolayers. Our study sheds light on the still unclear question how hBest1 gets in touch with biomembrane phospholipids of eukaryotic cells that might be of key importance for the proper structure and function of RPE biomembranes.

Резюме

Човешкият бестрофин-1 (hBest1) е трансмембранен канален протеин, предимно експресиран в мембраната на клетките на ретиналния пигментен епител (RPE). Въпреки че е ясно, че взаимодействията на hBest1 с липидите са от решаващо значение за неговата функция, такива изследвания не са провеждани, тъй като протеинът не е бил пречистен. Тук описваме ефективно пречистване на hBest1 от клетки от линията (MDCK - Madin-Darby Canine Kidney cells) чрез прости стъпки на гел филтрация и афинитетна хроматография, което прави възможно изследването на взаимодействието на протеина с липидите. Взаимодействието на пречистения hBest1 с 1-палмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (POPC) е изследвано в монослоеве на Langmuir. Изотермите на повърхностно налягане (π)-площ (A) и изоциклите на компресия/разширение на монослоя на POPC са регистрирани в отсъствие и присъствие на hBest1 в субфазата. Изотермите π(A) са анализирани по отношение на модула на повърхностна компресия и чрез двумерно уравнение на състоянието. Дилатационните реологични свойства на повърхностните филми и техният повърхностен потенциал също бяха измерени. Морфологията на филмите беше наблюдавана чрез микроскопия под ъгъл на Брюстър. Включването на протеина в субфазата на филма не водеше до дълбоко проникване на hBest1, а взаимодействието се осъществяваше в областта на главите на монослоя. Взаимодействието hBest1/POPC доведе до образуването на по-кондензирани филми, чиито реологични свойства и латерална структура се различаваха значително от чистите POPC монослоеве. Нашето проучване хвърля светлина върху все още неизяснения въпрос как hBest1 се свързва с биомембранните фосфолипиди на еукариотните клетки, което може да е от ключово значение за правилната структура и функция на биомембраните в клетките на ретиналния погментен епител.

Г. 11 *R. Ganeva, D. Parvanov, M. Handzhiyska, M. Ruseva, N. Stamenova, V. Moskova-Doumanova, G. Stamenov,* **How does the intrauterine administration of PBMC improve the endometrial immune environment?**, Journal of Reproductive Immunology, issue:170, 2025, pages:104599-0
https://doi.org/10.1016/j.jri.2025.104599
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:001546538800028

OBJECTIVE: The reproductive community is hesitant to endorse the use of immune therapies such as intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells (PBMC) for endometrial modulation in patients with repeated implantation failure (RIF). The main reason for this is the lack of objective indicators of the effect of these therapies. In addition, reproductive specialists are actively seeking approaches to study the specific mode of action of these therapies. Our previous study found a strong correlation between immunohistochemically examined immune ratios in the endometrium and successful implantation. Therefore, the aim of this study was to assess the effect of intrauterine administration of PBMC on the endometrial immune environment during IVF procedures.

METHODS: Prospective before/after study, that includes eighteen women, IVF patients, who had appointed intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were included in the study. Eligibility criteria were: having 2 or more unsuccessful embryotransfers with euploid embryos, absence of endometrial pathologies, absence of genetic, autoimmune endocrine diseases. The study was approved by IRB 10/12.04.2022. All participants have signed written informed consent.

Two endometrial biopsies were taken from each patient. The first biopsy was obtained 1-month prior PBMC administration, on day 7 after LH peak (LH+7). The next month they had intrauterine administration of autologous PBMC on day LH+5. The second endometrial sample was taken 2 days after PBMC administration, also on day LH+7, the next month regular single frozen embryo transfer (FET) on day LH+7 of euploid embryo was performed.

All endometrial samples were subjected to immunohistochemical staining against total T (tT), T helpers (Th), T killers (Tk), NK cells and Macrophages (MΦ) and were analysed on HALO visual software for cell quantification. Immune ratios NK/T, Tk/T, Th/T, MΦ/T, Th/Tk and Th/MΦ were evaluated.

PBMCs were obtained on day 4 after LH peak (LH+4) from 4 ml whole peripheral blood after gradient centrifugation for 25 min at 400 G. The PBMC content was analysed on FACSLyric. The buffy coat was isolated and cultivated for 24 h at 36.6°C. The media cytokines concentrations were measured by ELISA. In the same cycle, on day LH+5 of the menstrual cycle the cultivated PBMCs along with the culture media were administered in the uterine cavity under ultrasonographic guidance.

Standard single frozen embryo transfer of euploid embryo was performed and the outcome was assessed 14 days flowing FET by measuring blood hCG.

The evaluated immune cell ratios were compared before and after the treatment. Data analysis was performed on SPSS.

RESULTS: When the immune cell content and ratios were compared before and after the PBMC administration turned out that the Th percentage was significantly elevated following PBMC administration 0.58% (1.10) vs. 1.52% (1.49), $p=0.003$. The other immune cell percentages remained unchanged ($p>0.05$). When the immune cell ratios were compared before and after the treatment, Th/tT (0.17 (030) vs. 0.32 (0.39), respectively, $p=0.31$), Th/Tk (0.32 (0.44) vs. 0.55 (0.62), respectively, $p= 0.011$) and Th/MΦ (0.17 (0.31) vs. 0.46 (0.42), respectively, $p=0.037$) were significantly elevated, while NK/tT, Tk/tT and MΦ/tT remained similar ($p>0.05$).

Of the 18 patients included, 11 went through embryotransfer and 36.4% (4/11) of them had successful embryo implantation. When the immune ratios (after the treatment) were compared between successful and unsuccessful implantation groups it turned out that MΦ/tT ratio was significantly higher after the PBMC administration in patients with successful embryo implantation (1.93 (1.24) vs. 0.67 (1.08), respectively, $p= 0.006$). The other observed immune cell ratios were not significantly different between the two groups ($p>0.05$).

When the immune ratios were compared before and after the PBMC administration in the successful embryo implantation group it turned out that, again, MΦ/tT ratio was significantly

higher following treatment (1.21 (1.16) vs. 1.93 (1.13), respectively, p=0.048), despite МФ and tT cell percentages being similar before and after the PBMC administration (p>0.05). The other immune cell ratios did not differ before and after the treatment. Therefore, an elevated МФ/tT ratio may serve as a potential indicator of treatment efficacy and could contribute to successful embryo implantation in these women.

CONCLUSIONS: In our previous study the endometrial Th/tT, Th/Tk, Th/МФ, NK/tT, Tk/tT and МФ/tT ratios were significantly higher in women with successful embryo implantation. Here in this study, we observe that PBMC administration elevates Th/tT, Th/Tk and Th/МФ ratios and furthermore МФ/tT is significantly higher in women with successful embryo implantation following PBMC treatment. The elevated МФ/tT ratio following treatment may have contributed to the successful embryo implantation in the women who achieved pregnancy. Therefore, PBMC administration improves the endometrial immune environment in elevating Th/tT, Th/Tk and Th/МФ ratios and may improve the endometrial embryo receptivity by elevating МФ/tT ratio.

ЦЕЛ: Репродуктивната общност се колебае да препоръча използването на имунни терапии, като например вътрематочно приложение на автоложни периферни кръвни мононуклеарни клетки (PBMC) за ендометриална модулация при пациенти с повтаряща се имплантационна неуспех (RIF). Основната причина за това е липсата на обективни показатели за ефекта на тези терапии. Освен това, репродуктивните специалисти активно търсят подходи за изучаване на специфичния механизъм на действие на тези терапии. Наше предишно проучване установи силна корелация между имунохистохимично изследваните имунни съотношения в ендометриума и успешната имплантация. Поради това, целта на настоящото проучване беше да се оцени ефектът от вътрематочното приложение на PBMC върху ендометриалната имунна среда по време на IVF процедури.

МЕТОДИ: Това е проспективно проучване преди/след, което включваше осемнадесет жени, IVF пациенти, на които е назначено вътрематочно приложение на автоложни периферни кръвни мононуклеарни клетки (PBMC). Критериите за допустимост бяха: наличие на 2 или повече неуспешни ембриотрансфера с еуплоидни ембриони, липса на ендометриални патологии, липса на генетични, автоимунни ендокринни заболявания. Проучването е одобрено от IRB 10/12.04.2022. Всички участници са подписали писмено информирано съгласие.

От всяка пациентка са взети две ендометриални биопсии. Първата биопсия е взета 1 месец преди прилагането на PBMC, на 7-ия ден след пика на LH (LH+7). На следващия месец им е приложено вътрематочно администриране на автоложни PBMC на ден LH+5. Втората ендометриална проба е взета 2 дни след прилагането на PBMC, също на ден LH+7, а на следващия месец е извършен редовен трансфер на единичен замразен еуплоиден ембрион на ден LH+7.

Всички ендометриални проби са подложени на имунохистохимично оцветяване срещу общи Т-клртки (tT), Т хелпери (Th), Т убийци (Tk), NK клетки и макрофаги (МФ) и са анализирани с визуален софтуер HALO за количествено определяне на клетките. Оценени са имунните съотношения NK/T, Tk/T, Th/T, МФ/T, Th/Tk и Th/МФ.

PBMCs бяха получени на 4-ия ден след пика на LH (LH+4) от 4 ml тотална периферна кръв след градиентно центрофугиране за 25 минути при 400 G. Съдържанието на PBMC беше анализирано на FACSLyric. Клетките от образувалия себял пръстен (buffy coat) бяха изолирана и култивирана в продължение на 24 часа при 36,6°C. Концентрациите на цитокини в хранителната среда бяха измерени чрез ELISA. В същия цикъл, на ден LH+5 от менструалния цикъл, култивираните PBMCs заедно с хранителната среда бяха приложени в маточната кухина под ултразвуково наблюдение.

След извършен е стандартен трансфер на единичен еуплоиден замразен ембрион, резултатът е оценен 14 дни след преминаване на FET чрез измерване на hCG в кръвта.

Оценените съотношения на имунните клетки бяха сравнени преди и след лечението. Анализът на данните беше извършен на SPSS.

РЕЗУЛТАТИ: Когато съдържанието и съотношенията на имунните клетки бяха сравнени преди и след прилагането на PBMC, се оказа, че процентът на Th е значително повишен след прилагане на PBMC - 0,58% (1,10) спрямо 1,52% (1,49), p=0,003. Процентите на останалите имунни клетки останаха непроменени (p>0,05). Когато съотношенията на имунните клетки бяха сравнени преди и след лечението, Th/tT (съответно 0,17 (0,30) спрямо 0,32 (0,39), p=0,31), Th/Tk (съответно 0,32 (0,44) спрямо 0,55 (0,62), p=0,011) и Th/МФ (съответно 0,17 (0,31) спрямо 0,46 (0,42), p=0,037) бяха значително повишени, докато NK/tT, Tk/tT и МФ/tT останаха сходни (p>0,05).

От включените 18 пациенти, 11 преминаха през ембриотрансфер и 36,4% (4/11) от тях имаха успешна ембрионна имплантация. Когато имунните съотношения (след лечението) бяха сравнени между групите с успешна и неуспешна имплантация, се оказа, че съотношението МФ/tT е значително по-високо след прилагането на PBMC при пациенти с успешна ембрионна имплантация (съответно 1,93 (1,24) спрямо 0,67 (1,08), p = 0,006). Другите наблюдавани съотношения на имунните клетки не се различаваха значително между двете групи (p>0,05).

Когато имунните съотношения бяха сравнени преди и след прилагането на PBMC в групата с успешна ембрионна имплантация, се оказа, че отново съотношението МФ/tT е значително по-високо след лечението (съответно 1,21 (1,16) спрямо 1,93 (1,13), p = 0,048), въпреки че процентите на МФ и tT клетките бяха сходни преди и след прилагането на PBMC (p>0,05). Другите съотношения на имунните клетки не се различаваха преди и след лечението. Следователно, повишеното съотношение МФ/tT може да служи като потенциален индикатор за ефикасността на лечението и би могло да допринесе за успешна имплантация на ембриони при тези жени.

ЗАКЛЮЧЕНИЯ: В предишното ни проучване съотношенията ендометриални Th/tT, Th/Tk, Th/МФ, NK/tT, Tk/tT и МФ/tT бяха значително по-високи при жени с успешна ембрионна имплантация. В това проучване наблюдаваме, че приложението на PBMC повишава съотношенията Th/tT, Th/Tk и Th/МФ и освен това МФ/tT е значително по-високо при жени с успешна ембрионна имплантация след лечение с PBMC. Повишеното съотношение МФ/tT след лечението може да е допринесло за успешната ембрионна имплантация при жените, постигнали бременност. Следователно, приложението на PBMC подобрява ендометриалната имунна среда, като повишава съотношенията Th/tT, Th/Tk и Th/МФ, и може да подобри рецептивността към ембрионите на ендометриума, като повишава съотношението МФ/tT.

Г12. *R. Ganeva, D. Parvanov, V. Moskova-Doumanova, M. Ruseva, M. Handzhiyska, N. Vidolova, T. Tihomirova, S. Chapanova, D. Metodiev, G. Stamenov,* **Endometrial immune cell ratios alterations following administration of immunomodulated PBMC**, Journal of Reproductive Immunology, 2025, doi:10.1016/j.jri.2024.104375
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:001422987100041

Introduction with objective: One of the most promising immune treatments of patients with recurrent implantation failure is the intrauterine administration of immunomodulated peripheral blood mononuclear cells (PBMC). In order to describe the mechanism of action of

this treatment on endometrial immune environment, we compared the endometrial immune cell composition before and after intrauterine administration of immunomodulated PBMC.

Methods: In total 28 endometrial biopsies were obtained from 14 women (30- 46 years old), without endometrial pathologies, and having planned intrauterine administration of PBMC. Samples were obtained one month before the administration of PBMC on day 5 after luteinizing hormone (LH) peak and 4 days after the treatment. PBMCs were isolated from 12 ml blood after density gradient centrifugation using Pancoll (60100,Biotech) and were incubated in RPMI medium supplemented with 50 IU/ml IFNt for 24h at 37ºC. All samples underwent immunohistochemical staining against total T (tT) cells (CD3,IS503,Dako), T helper (Th) cells (CD4,IS64930-2,Dako), T killer (Tk) cells (CD8,IS62330-2,Dako), natural killer (NK) cells (CD56,IS62830-2,Dako) and macrophages (MΦ) (CD68,IS61330, Dako) using Novolink detection system (RE7280, Leica) according to the manufacturer's instructions. All slides were captured as tiff images at 40x magnification and the immune cells were quantified by HALO software (Indica Labs). Data were presented as percentage of positively stained stromal cells and immune cell ratios. This study was approved by the IRB (N7/28.02.2023) and has registered clinical trial (RCT: NCT05775211).

Results: No differences in the mean±SEM immune cell percentages of the studied cells before and after the performed treatment were found: 4.85±0.66% vs. 5.89 ±0.78% tT cells, 1.13±0.34% vs. 1.13±0.33% Th cells, 7.66 ±1.61% vs. 7.67±1.70% NK cells, 4.54±1.06% vs. 4.7±0.85% MΦs and 3.00±0.39% vs. 3.47±0.62% Tk cells. Most of the immune cell ratios also did not show significant difference before and after the treatment: 1.62±0.29 vs. 1.27±0.23 NK/tT, 0.23 ±0.06 vs. 0.34±0.05 Th/tT, 0.93±0.18 vs. 0.89±0.19 MΦ/tT, 0.45±0.15 vs. 0.62±0.11 Th/Tk. There was however difference in the mean Th/MΦ ratio being 0.28±0.07 before the treatment and 0.58±0.15 after the PBMC administration (p=0.05).

Conclusion: In conclusion, while no difference was observed in the quantities of the immune cells before and after the administration of immunomodulated PBMC, the Th/MΦ ratio was significantly higher after the treatment.

Въведение с цел: Един от най-обещаващите имунни методи за лечение на пациенти с рецидивиращи имплантационни неуспехи е вътрематочното приложение на имуномодулирани периферни кръвни мононуклеарни клетки (PBMC). За да опишем механизма на действие на това лечение върху ендометриалната имунна среда, сравнихме състава на ендометриалните имунни клетки преди и след вътрематочно приложение на имуномодулирани PBMC.

Методи: Общо 28 ендометриални биопсии бяха получени от 14 жени (възраст 30-46 години), без ендометриални патологии и с планирано вътрематочно приложение на PBMC. Пробите бяха получени един месец преди приложението на PBMC, на 5-ия ден след пика на лутеинизиращия хормон (LH) и 4 дни след лечението. PBMC бяха изолирани от 12 ml кръв след центрофугиране в плътностен градиент, използвайки Pancoll (60100, Biotech) и бяха инкубирани в RPMI среда, допълнена с 50 IU/ml IFNt, за 24 часа при 37ºC. Всички проби са подложени на имунохистохимично оцветяване срещу общи T (tT) клетки (CD3, IS503, Dako), Т-хелперни (Th) клетки (CD4, IS64930-2, Dako), Т-килъри (Tk) клетки (CD8, IS62330-2, Dako), клетки естествени убийци (NK) (CD56, IS62830-2, Dako) и макрофаги (МФ) (CD68, IS61330, Dako), използвайки система за детекция Novolink (RE7280, Leica), съгласно инструкциите на производителя. Всички препарати са заснети като tiff изображения при 40x увеличение и имунните клетки са количествено определени чрез софтуера HALO (Indica Labs). Данните са представени като процент от положително оцветени стромални клетки и съотношения на имунните клетки. Това проучване е одобрено от IRB (N7/28.02.2023) и има регистрирано клинично изпитване (RCT: NCT05775211).

Резултати: Не установихме разлики в средните проценти ± SEM на изследваните имунни клетки преди и след проведеното лечение: 4.85±0.66% спрямо 5.89 ±0.78% tT клетки, 1.13±0.34% спрямо 1.13±0.33% Th клетки, 7.66 ±1.61% спрямо 7.67±1.70% NK клетки, 4.54±1.06% спрямо 4.7±0.85% МФs и 3.00±0.39% спрямо 3.47±0.62% Tk клетки. Повечето от съотношенията на имунните клетки също не показват значителна разлика преди и след лечението: 1,62±0,29 спрямо 1,27±0,23 за NK/tT, 0,23 ±0,06 спрямо 0,34±0,05 за Th/tT, 0,93±0,18 спрямо 0,89±0,19 за МФ/tT, 0,45±0,15 спрямо 0,62±0,11 за Th/Tk. Има обаче разлика в средното съотношение Th/МФ, което е 0,28±0,07 преди лечението и 0,58±0,15 след прилагането на PBMC (p=0,05).

Заключение: В заключение, макар че не е наблюдавана разлика в количествата на имунните клетки преди и след прилагането на имуномодулирани PBMC, съотношението Th/МФ е значително по-високо след лечението.

Г13. *R. Ganeva, D. Parvanov, V. Moskova-Doumanova, M. Ruseva, M. Handzhiyska, N. Vidolova, T. Tihomirova, S. Chapanova, D. Metodiev, G. Stamenov,* **T-helper cells populations in the endometrium and peripheral blood during the window of implantation**, Journal of Reproductive Immunology, 2025, doi:10.1016/j.jri.2024.104353
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:001422987100017

Introduction with objective: T-helpers in the endometrium are crucial in sustaining the immune balance between protection and tolerance towards the embryo. Although their quantities are indicative for endometrial receptivity, the process of taking endometrial biopsy could be painful and may disrupt the endometrial cavity prior to embryo transfer. T-helpers subpopulations TH1, TH2, TH17 and TH9 in the peripheral blood (PB), however, could be easily measured by flow cytometry. The link between endometrial T-helper cells and their subpopulations in the PB is poorly studied. Therefore, we designed this study to search for association between endometrial T-helpers and their subpopulations in the PB.

Methods: Peripheral blood and endometrial tissue were obtained from 27 women (25 to 40 years old) undergoing IVF without endometrial pathologies. Both samples were taken during mid-secretory phase of the menstrual cycle (LH+7). All patients included in the study have signed written informed consent. Endometrial tissue was immunohistochemically stained against CD4 (EAB- 64006, Elabscience) for identification of T-helper cells and the positively stained stromal cells were quantified by HALO software. T helper cells populations (TH1, TH2, TH17 and TH9) in peripheral blood (4 ml) were characterized based on CD4 (FITC-labeled,21459043X2, Immunotools) CD194 (APC-labeled,130-117-376, Myltenyi Biotec), CD196 (PE-labeled,130-120-458, Myltenyi Biotec) and CD183 (PerCPlabeled, 353740, BioLegend) expression and measured by FACSCalibur. SPSS was used to analyse the data.

Results: Endometrial T-helper cells were measured as percentage of positively stained stromal cells. The median percentage (range) of CD4 in the endometrial stroma in all patients was 1.24% (3.14). T-helper cells populations in the peripheral blood were measured as percentage of FITC-CD4+ cells. The median percentage (range) of the T-helper cells populations were as follows: 21.57% (21.91) TH1 (CD4+CD183+CD196-CD194-), 10.11% (26.71) TH2 (CD4+CD183-CD194+CD196-), 4.31% (5.51) TH17 (CD4 +CD183-CD194+CD196+) and 15.60% (18.50) TH9 (CD4+CD196 +CD194-). Spearman correlation analysis revealed no correlations between endometrial T-helper cells and TH1, TH2 or TH17 from the peripheral blood (p>0.05). Significant negative correlation was observed between endometrial T-helper cells and peripheral blood TH9 (-0.75, p=0.05).

Conclusions: A strong association between endometrial T-helpers and TH9 population in the peripheral blood was found. This result shows that TH9 population could be indicative for the presence of T-helper cells in the endometrial stroma.

Въведение с цел: Т-хелперите в ендометриума са от решаващо значение за поддържането на имунния баланс между защитата и толерантността към ембриона. Въпреки че количествата им са показателни за ендометриалната рецептивност, процесът на вземане на ендометриална биопсия може да бъде болезнен и да наруши ендометриалната кухина преди ембриотрансфер. Субпопулациите на Т-хелперите TH1, TH2, TH17 и TH9 в периферната кръв (ПК) обаче могат лесно да бъдат измерени чрез флуоцитометрия. Връзката между ендометриалните Т-хелперни клетки и техните субпопулации в ПК е слабо проучена. Поради това, ние разработихме това проучване, за да търсим връзка между ендометриалните Т-хелпери и техните субпопулации в ПК.

Методи: Периферна кръв и ендометриална тъкан бяха получени от 27 жени (на възраст от 25 до 40 години), подложени на ин витро фертилизация, без ендометриални патологии. И двете проби бяха взети по време на средната секреторна фаза на менструалния цикъл (LH+7). Всички пациентки, включени в проучването, са подписали писмено информирано съгласие. Ендометриалната тъкан беше имунохистохимично оцветена срещу CD4 (EAB-64006, Elabscience) за идентифициране на Т-хелперни клетки, а положително оцветените стромални клетки бяха количествено определени чрез HALO софтуер. Популациите на Т-хелперни клетки (TH1, TH2, TH17 и TH9) в периферна кръв (4 ml) бяха характеризирани въз основа на експресията на CD4 (FITC-маркирани, 21459043X2, Immunotools), CD194 (APC-маркирани, 130-117-376, Myltenyi Biotec), CD196 (PE-маркирани, 130-120-458, Myltenyi Biotec) и CD183 (PerCP-маркирани, 353740, BioLegend) и измерени чрез FACSCalibur. SPSS беше използван за анализ на данните.

Резултати: Ендометриалните Т-хелперни клетки бяха измерени като процент от положително оцветените стромални клетки. Медианният процент (диапазон) на CD4 в ендометриалната строма при всички пациенти е 1,24% (3,14). Популациите на Т-хелперните клетки в периферната кръв бяха измерени като процент от FITC-CD4+ клетки. Медианният процент (диапазон) на популациите на Т-хелперните клетки е, както следва: 21,57% (21,91) TH1 (CD4+CD183+CD196-CD194-), 10,11% (26,71) TH2 (CD4+CD183-CD194+CD196-), 4,31% (5,51) TH17 (CD4 +CD183-CD194+CD196+) и 15,60% (18,50) TH9 (CD4+CD196 +CD194-). Корелационният анализ на Spearman не разкри корелации между ендометриалните Т-хелперни клетки и TH1, TH2 или TH17 от периферната кръв ($p>0,05$). Наблюдавахме значителна отрицателна корелация между ендометриалните Т-хелперни клетки и TH9 от периферната кръв (-0,75, $p=0,05$).

Заключения: Установена е силна връзка между ендометриалните Т-хелперни клетки и популацията на TH9 в периферната кръв. Този резултат показва, че популацията на TH9 може да е показателна за наличието на Т-хелперни клетки в ендометриалната строма.

Г14*. R. Ganeva, D. Parvanov, N. Vidolova, M. Ruseva, M. Handzhiyska, K. Arsov, I. Decheva, D. Metodiev, V. Moskova-Doumanova, G. Stamenov,* **Endometrial immune cell ratios and implantation success in patients with recurrent implantation failure**, JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY, vol:156, 2023, ISSN (print):0165-0378, ISSN (online):1872-7603, doi:10.1016/j.jri.2023.103816

https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85147804042&doi=10.1016%2fj.jri.2023.103816&partnerID=40&md5=b1baf415a6e69c3d6f567ef8bdea5587
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000931969000001

Abstract

The objective of this study was to compare the endometrial immune cells quantities and ratios during the midluteal phase between women with recurrent implantation failure (RIF) with successful and unsuccessful embryo implantation. For this purpose, endometrial biopsies from 116 women aged between 29 and 46 with history of RIF undergoing Assisted Reproductive Technology (ART) without endometrial pathologies were immunohistochemically stained for CD3 + T-cells, CD4 + T-helpers, CD8 + T-killers, CD14 + monocytes, CD68 + macrophages, CD56 + NK cells and CD79α+ B-cells. Endometrial immune cells quantities and ratios were compared based on the embryo implantation outcome in the subsequent embryo transfer cycle. Spearman correlation analysis and Mann-Whitney U test were used to analyse the obtained data. Patients who experienced successful implantation at the subsequent cycle had significantly lower percentage of CD3 + T cells, and higher ratios of CD4 + /CD8 + , CD4 + /CD3 + and CD68 + /CD3 + than the patients who experienced another failure in implantation. In addition, the ratios of CD3 + /CD14 + , CD79α+ /CD14 + and CD56 + /CD14 + were significantly lower in the successful implantation group than that in the unsuccessful one. A cut off value of CD68 + /CD3 + ratio higher than 0.85 (AUC 0.67, 95% CI 0.56–0.79), CD4 + /CD3 + ratio higher than 0.19 (AUC 0.67, 95% CI 0.56–0.79) and CD4 + /CD8 + ratio higher than 0.43 (AUC 0.62, 95% CI 0.50–0.73) could be predictive factors for successful implantation in RIF patients. Knowledge on the immune cell composition could assist in the evaluation of the endometrial receptivity in RIF patients.

Резюме

Целта на това проучване беше да се сравнят количествата и съотношенията на ендометриалните имунни клетки по време на средна лутеалната фаза при жени с рецидивиращи имплантационни неуспехи (RIF) с успешна и неуспешна ембрионална имплантация. За тази цел, ендометриални биопсии от 116 жени на възраст между 29 и 46 години с анамнеза за RIF, подложени на асистирана репродуктивна технология (ART) без ендометриални патологии, бяха имунохистохимично оцветени за CD3+ Т-клетки, CD4+ Т-хелпери, CD8+ Т-килъри, CD14+ моноцити, CD68+ макрофаги, CD56+ NK клетки и CD79α+ В-клетки. Количествата и съотношенията на ендометриалните имунни клетки бяха сравнени въз основа на резултата от ембрио-имплантацията в последващия цикъл на ембриотрансфер. За анализ на получените данни бяха използвани корелационен анализ на Spearman и U тест на Mann-Whitney. Пациентките, които са претърпели успешна имплантация в следващия цикъл, са имали значително по-нисък процент CD3+ Т-клетки и по-високи съотношения CD4+/CD8+, CD4+/CD3+ и CD68+/CD3+ в сравнение с пациентките, които са претърпели нов неуспех при имплантацията. Освен това, съотношенията CD3+/CD14+, CD79α+/CD14+ и CD56+/CD14+ бяха значително по-ниски в групата с успешна имплантация, отколкото в групата с неуспешна имплантация. Гранична стойност на съотношението CD68+/CD3+ по-висока от 0,85 (AUC 0,67, 95% CI 0,56–0,79), съотношение CD4+/CD3+ по-високо от 0,19 (AUC 0,67, 95% CI 0,56–0,79) и съотношение CD4+/CD8+ по-високо от 0,43 (AUC 0,62, 95% CI 0,50–0,73) биха могли да бъдат предсказващи фактори за успешна имплантация при пациенти с RIF. Познаването на състава на имунните клетки би могло да помогне при оценката на ендометриалната рецептивност при пациенти с RIF.

Г15. *R. Ganeva, G. Stamenov, D. Parvanov, V. Moskova-Doumanova, M. Ruseva, M. Handzhiyska, N. Vidolova, T. Tihomirova, S .Chapanova, D. Metodiev, M. Pancheva, M. Serafimova, B. Rukova, R. Staneva, S. Hadjidekova*, **Associations between endometrial microbiome and the local immune cell composition during the mid-secretory phase**, HUMAN REPRODUCTION, vol:38, issue:suppl 1, 2023, ISSN (print):0268-1161, ISSN (online):1460-2350
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:001023498701107

Study question: Is there an association between the endometrial microbiome and the local immune cell composition during the mid-secretory phase?

Summary answer: The percentage of endometrial neutrophils was negatively related to the highest number of microorganisms, while B-cells and T-helpers were positively related to certain bacterial taxa.

What is known already: Endometrial receptivity is strongly influenced by the local immune cell composition and its inflammatory status. Meanwhile, many studies on the endometrial microbiome and its impact on receptivity are arising. Knowing that bacterial composition has an effect on the immune system, it is worth studying the potential associations between the microbiome and immune cell populations in the endometrium during the mid-secretory phase. This relationship could adjust the magnitude of inflammation which has a strong effect on embryo implantation process. Investigations on the endometrial bacterial communities' effect on the local immune cell composition could be applied in improving assisted reproductive technologies.

Study design, size, duration: Prospective observational study performed between April 2021 and January 2023 in a private in vitro hospital. Endometrial biopsies were collected from 30 women aged between 34 and 45 years during the mid-secretory phase, on day 7 after LH surge. Patients with history of recent inflammatory disease, chronic endometritis, recent antibiotic treatment, endocrinological disorders, autoimmune diseases, oncological diseases, moderate or severe endometriosis, adenomyosis, uterine hyperplasia, and endometrial polyps were not included.

Participants/materials, setting, methods: B cells, T cells, T helpers, NK cells, macrophages and neutrophils in the endometrial stroma were identified by immunohistochemical staining with antibodies against CD79a (IS62, Dako), CD3 (BRB063, Zytomed), CD4 (IS649, Dako), CD56 (ff00121-0007, ScyTek), CD14 (E-AB-71017, Elabscience) and neutrophil elastase (950334, NOVUSBIO), respectively. The immune cell percentages were calculated by HALO image analysis software (version 2.3, IndicaLabs). Endometrial microbiota (EM) composition was analyzed after DNA isolation using 16S rRNA (v4-v5 region) gene sequencing.

Main results and the role of chance: Totally 271 bacterial species and 668 genera were identified in the endometrial samples. The median (range) immune cell percentages found were: 0.083% (0.49) B-cells, 0.974% (4.93) T-cells, 0.066% (0.44) T-helpers, 0.931% (5.36) NK-cells, 1.129% (3.11) macrophages and 0.207% (3.86) neutrophils.

Spearman analysis revealed significant correlations between T-helpers percentage and the relative abundance of Cutibacterium acnes (R=0.475, p=0.012) and its genus Cutibacterium (R=0.477, p=0.012) as well as between B-cells and the relative abundance of Bacteroides vulgatus (R=0.532, p=0.003) and its genus Bacteroides (R=0.457,p=0.013). NK-cells presence was not related to any of the found bacterial species or genus (p>0.05).

Neutrophils demonstrated significant correlations with the relative abundance of the highest number of species: Prevotella melaninogenica (R=-0.404, p=0.03), Butyrivibrio crossotus (R=0.433,p=0.02), Moraxella osloensis (R=-0.433, p=0.019), Blautia sp. (R=0.427, p=0.021), Alicyclobacillus acidocaldarius (R=-401,p=0.031) also related with the T cells

percentage (R=-0.380, p=0.042) and Acinetobacter lwoffii (R=-0.458, p=0.008) also related with the macrophages (R=-0.454, p=0.013). Among the studied species Alloprevotella tannerae was showing significant correlations with neutrophils (R=-0.0602, p-0.001), macrophages (R=-0.416, p=0.025) and T-cells (R=-0.464, p=0.011).

At genus level, most of the bacteria were related to the neutrophils – Pseudoalteromonas (R=-0.540, p=0.002), Aliterella (R=-0.617, p<0.001), Endhydrobacter (R=-0.433,p=0.019) and AKIW781 (R=-0.493, p=0.011). Aliterella and AKIW781 were also related to the macrophages (R=-0.473, p-=¼0.01 and R=-0.423, p=0.031, respectively) and T-cells (R=-0.387, p=0.038 and R=-0.519, p=0.007, respectively).

Limitations, reasons for caution: The study was limited in sample size.

Wider implications of the findings: The results of this study indicated that there is a quantitative relation between the main endometrial immune cells and the endometrial core microbiome. The association between these two determinants of endometrial receptivity could help in understanding the fine tuning of the endometrium for accepting the embryo.

Изследователски въпрос: Има ли връзка между ендометриалния микробиом и състава на локалните имунни клетки по време на средната секреторна фаза?

Обобщен отговор: Процентът на ендометриалните неутрофили е отрицателно свързан с най-големия брой микроорганизми, докато В-клетките и Т-хелперите са положително свързани с определени бактериални таксони.

Какво вече е известно: Ендометриалната рецептивност е силно повлияна от състава на локалните имунни клетки и техния възпалителен статус. Междувременно се появяват много изследвания върху ендометриалния микробиом и неговото влияние върху рецептивността. Знаейки, че бактериалният състав има ефект върху имунната система, си струва да се проучат потенциалните връзки между микробиома и популациите на имунни клетки в ендометриума по време на средната секреторна фаза. Тази връзка може да коригира степента на възпаление, което има силен ефект върху процеса на имплантация на ембриона. Изследванията върху ефекта на ендометриалните бактериални общности върху състава на локалните имунни клетки могат да бъдат приложени за подобряване на асистираните репродуктивни технологии.

Дизайн, размер, продължителност на изследването: Проспективно обсервационно проучване, проведено между април 2021 г. и януари 2023 г. в частна ин витро болница. Ендометриални биопсии са събрани от 30 жени на възраст между 34 и 45 години по време на средната секреторна фаза, на 7-ия ден след пика на LH. Пациентки с анамнеза за скорошно възпалително заболяване, хроничен ендометрит, скорошно антибиотично лечение, ендокринологични нарушения, автоимунни заболявания, онкологични заболявания, умерена или тежка ендометриоза, аденомиоза, маточна хиперплазия и ендометриални полипи не са включени.

Участници/материали, обстановка, методи: В клетки, Т клетки, Т хелпери, NK клетки, макрофаги и неутрофили в ендометриалната строма бяха идентифицирани чрез имунохистохимично оцветяване с антитела съответно срещу CD79a (IS62, Dako), CD3 (BRB063, Zytomed), CD4 (IS649, Dako), CD56 (ff00121-0007, ScyTek), CD14 (E-AB-71017, Elabscience) и неутрофилна еластаза (950334, NOVUSBIO). Процентите на имунните клетки бяха изчислени чрез софтуер за анализ на изображения HALO (версия 2.3, IndicaLabs). Съставът на ендометриалната микробиота (EM) беше анализиран след изолиране на ДНК, използвайки генно секвениране на 16S rRNA (v4-v5 регион).

Основни резултати и ролята на случайността: Общо 271 бактериални вида и 668 рода бяха идентифицирани в ендометриалните проби. Медианните (диапазон) проценти на имунните клетки бяха: 0,083% (0,49) В-клетки, 0,974% (4,93) Т-клетки,

0,066% (0,44) Т-хелпери, 0,931% (5,36) NK-клетки, 1,129% (3,11) макрофаги и 0,207% (3,86) неутрофили.

Анализът на Spearman разкри значителни корелации между процента на Т-хелперите и относителното изобилие на Cutibacterium acnes (R=0,475, p=0,012) и неговия род Cutibacterium (R=0,477, p=0,012), както и между В-клетките и относителното изобилие на Bacteroides vulgatus (R=0,532, p=0,003) и неговия род Bacteroides (R=0,457, p=0,013). Наличието на NK-клетки не корелираше с нито един от откритите бактериални видове или родове (p>0,05).

Неутрофилите демонстрираха значителни корелации с относителното изобилие на най-голям брой видове: Prevotella melaninogenica (R=-0.404, p=0.03), Butyrivibrio crossotus (R=0.433, p=0.02), Moraxella osloensis (R=-0.433, p=0.019), Blautia sp. (R=0.427, p=0.021), Alicyclobacillus acidocaldarius (R=-401, p=0.031), също корелираха с процента на Т-клетките (R=-0.380, p=0.042) и Acinetobacter lwoffii (R=-0.458, p=0.008), също свързани с макрофагите (R=-0.454, p=0.013). Сред изследваните видове, Alloprevotella tannerae показва значителни корелации с неутрофили (R=-0.0602, p-0.001), макрофаги (R=-0.416, p=0.025) и Т-клетки (R=-0.464, p=0.011).

На родово ниво, повечето бактерии показаха корелация с неутрофилите – Pseudoalteromonas (R=-0.540, p=0.002), Aliterella (R=-0.617, p<0.001), Endhydrobacter (R=-0.433, p=0.019) и AKIW781 (R=-0.493, p=0.011). Aliterella и AKIW781 също корелираха с макрофагите (R=-0,473, p-=¼0,01 и R=-0,423, p=0,031, съответно) и Т-клетките (R=-0,387, p=0,038 и R=-0,519, p=0,007, съответно).

Ограничения, причини за предпазливост: Проучването беше с ограничен размер на извадката.

По-широки последици от констатациите: Резултатите от това проучване показват, че съществува количествена връзка между основните ендометриални имунни клетки и ендометриалния микробиом. Връзката между тези две детерминанте на ендометриалната рецептивност би могла да помогне за разбирането на фината настройка на ендометриума за приемане на ембриона.

Г16. *R. Ganeva, D. Parvanov, M. Ruseva, M. Handzhiyska, N. Vidolova, V. Moskova-Doumanova, D. Metodiev, G. Stamenov,* **ENDOMETRIAL MACROPHAGES AND EMBRYO IMPLANTATION**, FERTILITY & STERILITY, vol:120, issue:4, 2023, ISSN (print):0015-0282, ISSN (online):1556-5653, DOI:https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2023.08.429 https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:001084670200325

OBJECTIVE

It has been suggested that macrophages have key role in assembling the immune tolerance during the process of embryo implantation. In the mid-secretory endometrium, however, different sets of macrophages are present depending on their inflammatory action.

The aim was to compare the main macrophages populations' quantity and spatial distribution in the mid-secretory endometrium between women with successful and failed embryo implantation.

MATERIALS AND METHODS

Endometrial tissue from 20 patients with successful and 20 with failed embryo implantation, without inflammation and endometrial pathologies were selected from the hospitals tissue bank. All samples were obtained by regular diagnostic biopsy during mid-luteal

phase of the menstrual cycle (LH+7) from unstimulated IVF patients 1- month prior embryo transfer.

All samples were immunohistochemically stained against 3 sets of macrophages: pan-macrophages (CD68+, IS61330-2, Dako), anti-inflammatory macrophages (CD163+, 2-CD353-13, Quartett) and pro-inflammatory macrophages (CD11c+, 60258-1, Proteintech), using novolink polymer detection system (RE7280-K, Leica) according to the manufacturer's instructions.

The studied immune cells quantity and density were analysed by HALO image analysis software (Indica Labs) using the CytoNuclear and Spatial Analysis modules. Number of cells per mm^2 and max number of cells per μm^2 in 50μm radius in both groups were compared by Mann-Whitney U test.

RESULTS

Median number (range) of macrophages in the successful and the failed embryo implantation groups are: 277/ mm^2 (402) and 211/ mm^2 (297), respectively CD68+ cells; 93/ mm^2 (188) and 100/ mm^2 (127), respectively CD163+ cells with no significant differences between the two groups ($p>0.05$). Significantly higher number of CD11c+ cells, however, were observed in the successful embryo implantation group when compared to the failed one – 58/ mm^2 (114) and 21/ mm^2 (56), respectively, $p<0.013$.

In terms of spatial distribution, the density of pro- and anti-inflammatory macrophages in 50 μm radius of each cell in both successful and failed embryo implantation groups were not significantly different: $3.6x10^3/ \mu m^2$ (3.3) and $3.3x10^3/\mu m^2$ (3.2) for CD11c+ cells ($p=0.57$); $2.7x10^3/ \mu m^2$ (4.3) and $2.3x10^3/ \mu m^2$ (3.6) for CD163+ cells ($p=0.33$). While the density of CD68+ macrophages was significantly higher in the successful embryo implantation patients when compared to the failed ones: $2.2x10^3/\mu m2$ (2.9) and $1.4x10^3/ \mu m^2$ (1.7), respectively, $p=0.015$.

CONCLUSIONS

Higher number of anti-inflammatory macrophages indicated for successful embryo implantation. Clusters of pro- and anti-inflammatory macrophages were not related to embryo implantation outcome, in contrast to pan-macrophages density, which was higher in the successful embryo implantation cases.

IMPACT STATEMENT

The number of anti-inflammatory macrophages and pan-macrophages density in 50μm radius could indicate for endometrial receptivity and could be used as markers of immune status of ART patients. Future studies are needed to further evaluate their importance on embryo implantation.

ЦЕЛ

Предполага се, че макрофагите играят ключова роля в изграждането на имунната толерантност по време на процеса на имплантация на ембриона. В средно-секреторния ендометриум обаче присъстват различни групи макрофаги в зависимост от тяхното възпалително действие. Целта беше да се сравни количеството и пространственото разпределение на основните популации на макрофаги в средно-секреторния ендометриум между жени с успешна и неуспешна имплантация на ембриона.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Ендометриална тъкан от 20 пациентки с успешна и 20 с неуспешна имплантация на ембриона, без възпаление и ендометриални патологии, беше избрана от тъканната банка на болницата. Всички проби бяха получени чрез редовна диагностична биопсия по време на средната лутеална фаза на менструалния цикъл (LH+7) от нестимулирани пациентки с ин витро фертилизация, 1 месец преди ембриотрансфер. Всички проби бяха имунохистохимично оцветени срещу 3 комплекта макрофаги: пан-макрофаги (CD68+,

IS61330-2, Dako), противовъзпалителни макрофаги (CD163+, 2-CD353-13, Quartett) и провъзпалителни макрофаги (CD11c+, 60258-1, Proteintech), използвайки полимерна система за детекция novolink (RE7280-K, Leica) съгласно инструкциите на производителя. Количеството и плътността на изследваните имунни клетки бяха анализирани чрез софтуер за анализ на изображения HALO (Indica Labs), използвайки модулите CytoNuclear и Spatial Analysis. Броят на клетките на mm^2 и максималният брой клетки на μm^2 в радиус от 50 μm в двете групи бяха сравнени чрез U-тест на Mann-Whitney.

РЕЗУЛТАТИ

Медианният брой (диапазон) на макрофагите в групата с успешна и неуспешна имплантация на ембриони е: съответно 277/ mm^2 (402) и 211/ mm^2 (297) CD68+ клетки; 93/ mm^2 (188) и 100/ mm^2 (127), съответно CD163+ клетки, без значителни разлики между двете групи ($p>0,05$). Значително по-висок брой CD11c+ клетки обаче бе наблюдаван в групата с успешна ембрионална имплантация в сравнение с тази с неуспешна – съответно 58/ mm^2 (114) и 21/ mm^2 (56), $p<0,013$.

По отношение на пространственото разпределение, плътността на про- и противовъзпалителните макрофаги в радиус от 50 μm на всяка клетка както в групата с успешна, така и в групата с неуспешна ембрионална имплантация не се различаваше значително: $3,6x10^3/\mu m^2$ (3,3) и $3,3x10^3/\mu m^2$ (3,2) за CD11c+ клетки ($p=0,57$); $2,7x10^3/\mu m^2$ (4,3) и $2,3x10^3/\mu m^2$ (3,6) за CD163+ клетки ($p=0,33$). Плътността на CD68+ макрофагите беше значително по-висока при пациентите с успешна ембрионална имплантация в сравнение с тези с неуспешна: съответно $2,2x10^3/\mu m2$ (2,9) и $1,4x10^3/\mu m^2$ (1,7), $p=0,015$.

ЗАКЛЮЧЕНИЯ

По-висок брой противовъзпалителни макрофаги е индикация за успешна ембрионална имплантация. Клъстерите от про- и противовъзпалителни макрофаги не са свързани с резултата от ембрионалната имплантация, за разлика от плътността на пан-макрофагите, която е по-висока при случаите на успешна ембрионална имплантация.

ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ВЪЗДЕЙСТВИЕТО

Броят на противовъзпалителните макрофаги и плътността на пан-макрофагите в радиус от 50 μm могат да показват ендометриална рецептивност и могат да се използват като маркери за имунния статус на пациентите при асистирана репродуктивна терапия (АРТ). Необходими са бъдещи проучвания, за да се оцени по-нататък тяхното значение за ембрионалната имплантация.

Г17. *R. Ganeva, D. Parvanov, M. Handzhiyska, N. Vidolova, M. Ruseva, D. Metodiev, V. Moskova-Doumanova, G. Stamenov,* **Stem cells association to the immune cell populations of the human endometrium during the window of implantation**, Human Reproduction 37(Supplement_1), 2022, ISSN (print):0268-1161, ISSN (online):1460-2350, doi:DOI: 10.1093/humrep/deac107.729 https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000840076005111

Study question: Are endometrial stem cells associated with endometrial immune cell populations during the window of implantation?

Summary answer: Endometrial stem cells are associated with the presence of macrophages and B-cells, but do not correlate to T-cells and natural killer (NK) cells.

What is known already: The endometrial stem cells are essential for the periodic uterine regeneration. Besides their role in tissue remodeling it has been recently shown that they exert immunomodulatory and anti-inflammatory effect on the components of the immune system. A well known fact is that the immune cell composition of the endometrium during the window of

implantation is pivotal for the successful embryo implantation. There are only a few publications that study the association of the endometrial stem cells with the immune cells with regard to the window of implantation.

Study design, size, duration: Single center prospective study analyzing the cell composition of endometrial samples from women undergoing IVF. A total of 109 patients without endometrial pathologies were recruited for endometrial biopsy between March 2020 and January 2022. Endometrial samples were obtained on day 7 after LH peak in the presumed window of implantation and processed to formalin-fixed, paraffin-embedded slices for immunohistochemical analysis. This study received the approval of the hospital's medical ethics committee.

Participants/materials, setting, methods: Tissue sections were immunohistochemically stained for CD117 and NOTCH1 as stem cell markers as well as for immune cells with CD3 (T-cells), CD8 (T-killers), CD4 (T-helpers), CD56 (NK cells), CD68 (Macrophages), CD14 (Macrophages) and CD79a (B-cells) antibodies. The percentage of positively stained stromal cells was evaluated by Image-J software in the same tissue area for each sample. Statistical analysis: Spearman correlation, $p<0.05$ was considered significant.

Main results and the role of chance: Immunohistochemical analysis showed that NOTCH1 and CD117 positive stem cells are present in all samples with mean 0.133±0.029% and 0.034±0.004%, respectively, and they were significantly correlated ($R=0.397$, $p<0.001$). The presence of CD3+ T-cells, CD4+ T-helpers, CD8+ T-killers, CD56+ NK cells, CD79α+ B cells, CD68+ macrophages, CD14+ macrophages was also confirmed with mean 1.133±0.259%, 0.374±0.058%, 0.074±0.013%, 0.883±0.184%, 0.188±0.060%, 1.018±0.202% and 1.309±0.257%, respectively.

Spearman analysis revealed significant positive correlation between NOTCH1 positive stem cells and CD79a+ B-cells ($R=0.211$, $p=0.029$), CD14+ macrophages ($R=0.231$, $p=0.017$), but no relation to the other studied immune cell types was observed ($p>0.05$).

Significant positive correlation between CD117 positive stem cells and CD14+ macrophages ($R=0.262$, $p=0.007$), CD68+ macrophages ($R=0.216$, $p=0.025$) and no relation to the other studied immune cell types was observed ($p>0.05$).

When the immune cells ratios were evaluated and analysed for correlation with stem cells, it turned out that only CD117 positive stem cells are significantly correlated to CD8+ T-killers/CD68+ macrophages ratio ($R=-0.274$, $p=0.007$).

Limitations, reasons for caution: In this study only immunohistochemical analysis was used. In future studies flow cytometrical quantification of the studied cells will be used. Also more immune cell subtypes should be included in the analysis to further characterise the stem cells association to the immune cell populations.

Wider implications of the findings: During the window of implantation the endometrial stem cells are associated to the macrophages distribution. In contrast to NOTCH1+, CD117+ stem cells relate to the endometrial B-cells. These findings confirm the role of the endometrial stem cells in the fine tuning of the immune behavior during the window of implantation.

Изследователски въпрос: Свързани ли са ендометриалните стволови клетки с популациите на ендометриалните имунни клетки по време на имплантационния прозорец?

Обобщен отговор: Ендометриалните стволови клетки са свързани с наличието на макрофаги и В-клетки, но не корелират с Т-клетки и естествени клетки убийци (NK).

Какво вече е известно: Ендометриалните стволови клетки са от съществено значение за периодичната регенерация на матката. Освен ролята им в тъканното ремоделиране, наскоро беше показано, че те упражняват имуномодулиращ и противовъзпалителен ефект върху компонентите на имунната система. Добре известен

факт е, че имунно-клетъчният състав на ендометриума по време на имплантационния прозорец е ключов за успешната имплантация на ембриона. Има само няколко публикации, които изследват връзката на ендометриалните стволови клетки с имунните клетки по отношение на имплантационния прозорец.

Дизайн, размер, продължителност на изследването: Едноцентрово проспективно проучване, анализиращо клетъчния състав на ендометриални проби от жени, подложени на ин витро оплождане. Общо 109 пациенти без ендометриални патологии бяха набрани за ендометриална биопсия между март 2020 г. и януари 2022 г. Ендометриалните проби бяха получени на 7-ия ден след пика на LH в предполагаемия прозорец на имплантация и обработени като формалин-фиксирани, парафин-вградени срезове за имунохистохимичен анализ. Това проучване получи одобрението на комисията по медицинска етика на болницата.

Участници/материали, обстановка, методи: Тъканните срези бяха имунохистохимично оцветени за CD117 и NOTCH1 като маркери на стволови клетки, както и за имунни клетки с антитела за CD3 (Т-клетки), за CD8 (Т-килъри), за CD4 (Т-хелпери), за CD56 (NK клетки), за CD68 (макрофаги), за CD14 (макрофаги) и за CD79a (В-клетки). Процентът на положително оцветените стромални клетки беше оценен чрез софтуера Image-J в същата тъканна област за всяка проба.

Статистически анализ: Корелация на Spearman, $p < 0,05$ се счита за значима.

Основни резултати и ролята на случайността: Имунохистохимичният анализ показа, че стволови клетки, позитивни за NOTCH1 и CD117, присъстват във всички проби със средно 0,133±0,029% и 0,034±0,004%, съответно, и те са значително корелирани (R=0,397, p<0,001). Наличието на CD3+ Т-клетки, CD4+ Т-хелпери, CD8+ Т-килъри, CD56+ NK клетки, CD79α+ В клетки, CD68+ макрофаги, CD14+ макрофаги също беше потвърдено със средно 1,133±0,259%, 0,374±0,058%, 0,074±0,013%, 0,883±0,184%, 0,188±0,060%, 1,018±0,202% и 1,309±0,257%, съответно.

Анализът на Spearman разкри значителна положителна корелация между NOTCH1-позитивните стволови клетки и CD79a+ В-клетките (R=0.211, p=0.029), CD14+ макрофагите (R=0.231, p=0.017), но не се наблюдава връзка с другите изследвани типове имунни клетки (p>0.05).

Не се наблюдава значителна положителна корелация между CD117-позитивните стволови клетки и CD14+ макрофагите (R=0.262, p=0.007), CD68+ макрофагите (R=0.216, p=0.025), и не се наблюдава връзка с другите изследвани типове имунни клетки (p>0.05).

Когато съотношенията на имунните клетки бяха оценени и анализирани за корелация със стволовите клетки, се оказа, че само CD117-позитивните стволови клетки са значително корелирани със съотношението CD8+ Т-килъри/CD68+ макрофаги (R=-0.274, p=0.007).

Ограничения, причини за предпазливост: В това проучване е използван само имунохистохимичен анализ. В бъдещи проучвания ще се използва флоуцитометрично количествено определяне на изследваните клетки. Също така в анализа трябва да бъдат включени повече имунни клетъчни подтипове, за да се характеризира по-добре асоциацията на стволовите клетки с популациите на имунните клетки.

По-широки последици от откритията: По време на имплантационния прозорец ендометриалните стволови клетки са свързани с разпределението на макрофагите. За разлика от NOTCH1+, CD117+ стволовите клетки са свързани с ендометриалните В-клетки. Тези открития потвърждават ролята на ендометриалните стволови клетки във фината настройка на имунното поведение по време на имплантационния прозорец.

Г18. *R. Ganeva, D. Parvanov, M. Handzhiyska, M. Ruseva, N. Vidolova, V. Moskova-Doumanova, D. Metodiev, G. Stamenov,* **A PILOT STUDY ON THE SPATIAL ORGANISATION OF THE ENDOMETRIAL IMMUNE POPULATIONS IN RELATION TO EMBRYO IMPLANTATION OUTCOME**, Fertility and Sterility, vol:118, issue:4, 2022, pages:378-0, doi:https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.09.213
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000891804601194

OBJECTIVE

It has been proposed that the endometrial immune cells organise aggregates with a B cell core surrounded by T cells, monocytes and macrophages and that their mutual regulation can be influenced by their spatial proximity. The endometrial immune cells' spatial localisation has not been studied with regard to embryo implantation success yet. The aim of this study was to compare the distances from total T cells (TT), T killer cells (Tk), monocytes (Mon) and macrophages (Maph) to B cells in the endometrial stroma from women with successful and unsuccessful embryo implantation.

MATERIALS AND METHODS

Endometrial samples from 14 patients with unsuccessful and 16 with successful embryo implantation were selected from tissue bank. Biopsies were obtained from unstimulated female IVF patients, without endometrial pathologies, during the mid-luteal phase. The endometrial samples were immunohistochemically stained with antibodies against B cells (CD79a, IS621 Dako), Mon (CD14, 71017 Elabscience), TT (CD3, BRB063 Zytomed), Tk (CD8, CD040 Quartet) and Maph (CD68, 71017 Elabscience) using novolink polymer detection system (RE7280, Leica) according to the manufacturers instructions. Cell quantification and nearest neighbour analysis were performed by HALO software at 0.5 microns/pixel resolution. Spearman correlation and Mann-Whitney U test were carried on SPSS v.21.

RESULTS

The median percentage and ranges of immune cells in the successful embryo implantation group were: 0.096% (0.01-5.57) B cells, 0.067% (0.03-11.32) TT cells, 0.601% (0.29-4.99) Tk cells, 0.581% (0.45- 15.19) Mon and 0.775% (0.23-14.44) Maph, while in the unsuccessful group were: 0.091% (0.01-3.07) B cells, 0.646% (0.36-13.44) TT cells, 0.275% (0.23-7.62) Tk cells, 0.581% (0.17-12.75) Mon and 0.637% (0.23-14.44) Maph. Significant differences in the median percentages of the immune cells between the two groups were not observed ($p>0.05$).

The mean distances between B cells and the nearest TT cells (43.56±17.33 μm), Tk cells (81.87±52.15 μm), Mon (44.44±15.36 μm) and Maph (42.11±17.58 μm) in the successful embryo implantation group, were generally larger than the distances to the nearest TT cells (17.8±11.33 μm), Tk cells (43.56±20.92 μm), Mon (25.48±22.80 μm) and Maph (23.05±15.56 μm) in the unsuccessful group. Significant differences were observed in the distances from the nearest TT cells and Tk cells to B cells between both studied groups ($p=0.05$, $p=0.03$, respectively).

CONCLUSIONS

The distances between T lymphocytes and B cells differ in the mid luteal endometrium of successful and unsuccessful embryo implantation patients showing dysregulated B-T cell interaction in the cases of unsuccessful implantation.

IMPACT STATEMENT

By far this is the first report on the endometrial immune cells distribution effect on embryo implantation outcome. These results reveal a new aspect of the immune regulation of the endometrium during the implantation window that is poorly studied. More research is needed to further evaluate the impact of the spatial distribution of the endometrial immune cells on fertility.

ЦЕЛ

Предполага се, че ендометриалните имунни клетки организират агрегати с В-клетъчно ядро, заобиколено от Т-клетки, моноцити и макрофаги, и че тяхната взаимна регулация може да бъде повлияна от пространствената им близост. Пространствената локализация на ендометриалните имунни клетки все още не е проучена по отношение на успеха на имплантацията на ембриона. Целта на това проучване беше да се сравнят разстоянията от общите Т-клетки (ТТ), Т-клетките убийци (Tk), моноцитите (Mon) и макрофагите (Maph) до В-клетките в ендометриалната строма при жени с успешна и неуспешна имплантация на ембриона.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Ендометриални проби от 14 пациентки с неуспешна и 16 с успешна имплантация на ембриона бяха избрани от тъканна банка. Биопсиите бяха получени от нестимулирани жени пациентки с ин витро, без ендометриални патологии, в средата на лутеалната фаза. Ендометриалните проби бяха имунохистохимично оцветени с антитела срещу В клетки (CD79a, IS621 Dako), Mon (CD14, 71017 Elabscience), ТТ (CD3, BRB063 Zytomed), Tk (CD8, CD040 Quartet) и Maph (CD68, 71017 Elabscience), използвайки полимерна система за детектиране novolink (RE7280, Leica) съгласно инструкциите на производителя. Количественото определяне на клетките и анализът на най-близките съседи бяха извършени с помощта на софтуер HALO с резолюция 0,5 микрона/пиксел. Корелацията на Spearman и U-тестът на Mann-Whitney бяха проведени с SPSS v.21.

РЕЗУЛТАТИ

Средният процент и диапазоните на имунните клетки в групата с успешна ембрионална имплантация бяха: 0,096% (0,01-5,57) В клетки, 0,067% (0,03-11,32) ТТ клетки, 0,601% (0,29-4,99) Tk клетки, 0,581% (0,45-15,19) Mon и 0,775% (0,23-14,44) Maph, докато в групата с неуспешна имплантация бяха: 0,091% (0,01-3,07) В клетки, 0,646% (0,36-13,44) ТТ клетки, 0,275% (0,23-7,62) Tk клетки, 0,581% (0,17-12,75) Mon и 0,637% (0,23-14,44) Maph. Не наблюдавахме значителни разлики в средните проценти на имунните клетки между двете групи ($p>0,05$).

Средните разстояния между В клетките и най-близките ТТ клетки (43,56±17,33 μm), Tk клетки (81,87±52,15 μm), Mon (44,44±15,36 μm) и Maph (42,11±17,58 μm) в групата с успешна ембрионална имплантация, като цяло бяха по-големи от разстоянията до най-близките ТТ клетки (17,8±11,33 μm), Tk клетки (43,56±20,92 μm), Mon (25,48±22,80 μm) и Maph (23,05±15,56 μm) в групата с неуспешна имплантация. Значителни разлики бяха наблюдавани в разстоянията от най-близките ТТ клетки и Tk клетки до В клетки между двете изследвани групи (съответно $p=0,05$, $p=0,03$).

ЗАКЛЮЧЕНИЯ

Разстоянията между Т-лимфоцитите и В-клетките се различават в средния лутеален ендометриум на пациенти с успешна и неуспешна имплантация на ембриони, показващи нарушено взаимодействие между В-Т клетките в случаите на неуспешна имплантация.

ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ВЪЗДЕЙСТВИЕТО

Това е първият доклад за влиянието на разпределението на ендометриалните имунни клетки върху резултата от имплантацията на ембриони. Тези резултати разкриват нов аспект на имунната регулация на ендометриума по време на имплантационния прозорец, който е слабо проучен. Необходими са повече изследвания, за да се оцени по-нататък влиянието на пространственото разпределение на ендометриалните имунни клетки върху фертилитета.

Г19. *H. Penchev, E. Dimitrov, Ch. Novakov, E. Haladjova, R. Veleva, V. Moskova-Doumanova, T. Topouzova-Hristova, S. Rangelov,* **Water-Soluble Polyglycidol-Grafted Ladder Calix Resorcinarene Oligomers with Open Chain and Cyclic Topologies: Synthesis, Characteristics, and Biological Evaluation**, Polymers, vol:16, 2024, pages:3219-0, ISSN (online):2073-4360, doi:https://doi.org/10.3390/polym16223219
https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85210153295&doi=10.3390%2fpolym16223219&partnerID=40&md5=2e9672ff383666902cb44af80d438b47
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:001365850100001

Abstract

Ladder oligomers containing calixarene skeletons in the main chain—calix[4]resorcinarene (CRA) ladder macromolecules with open chain and cyclic macromolecules with double ring-like (Noria-type) topologies—bring particular research attention as functional materials with various applications. However, there is still a remarkable lack of studies into the synthesis of fully water-soluble derivatives of these interesting macromolecules. Research on this topic would allow their bio-based research and application niche to be at least revealed. In the present study, a strategy for the synthesis of water-soluble polyglycidol-derivatized calix resorcinarene ladder oligomers with open chain and cyclic structures is introduced. A grafting from approach was used to build branched or linear polyglycidol chains from the ladder scaffolds. The novel structures were synthesized in quantitative yields and fully characterized by NMR, FTIR and UV–vis spectroscopy, gel permeation chromatography, MALDI-TOF mass spectrometry, analytical ultracentrifugation, and static light scattering to obtain the molar mass characteristics and composition. The biocompatibility and toxicity of the two polyglycidol-derivatized oligomers were investigated and the concentration dependence of the survival of three cell lines of human origin determined. The selective apoptosis effect at relatively low dissolve concentrations toward two kinds of cancerous cell lines was found.

Резюме

Стълбовидните олигомери, съдържащи каликсаренови скелети в основната верига – каликс[4]резорцинарен (CRA) стълбовидни макромолекули с отворена верига и циклични макромолекули с двойно пръстеновидни (тип Нория) топологии – привличат особено изследователско внимание като функционални материали с различни приложения. Въпреки това, все още има забележителна липса на изследвания върху синтеза на напълно водо-разтворими производни на тези интересни макромолекули. Изследванията по тази тема биха позволили поне да се разкрие тяхната био-базирана изследователска и приложна ниша. В настоящото изследване е въведена стратегия за синтез на водо-разтворими полиглицидол-дериватизирани каликс резорцинарнови стълбовидни олигомери с отворена верига и циклични структури. Използван е подход на присаждане за изграждане на разклонени или линейни полиглицидолови вериги от стълбовите скелета. Новите структури бяха синтезирани с количествени добиви и напълно характеризирани чрез NMR, FTIR и UV-vis спектроскопия, гел-проникваща хроматография, MALDI-TOF масспектрометрия, аналитично ултрацентрофугиране и статично разсейване на светлината, за да се получат характеристиките на моларната маса и състава. Върху три клетъчни линии от човешки произход беше изследвана биосъвместимостта и концентрациоono – зависимата токсичност на двата полиглицидол-дериватизирани олигомера. Установен бе селективен апоптозен ефект при относително ниски концентрации на разтвора спрямо два вида ракови клетъчни линии.

Г20. *K. Mladenova, E. Dimitrov, N. Toncheva-Moncheva, R. Kalinova, I. Dimitrov, P. Bakardzhiev, V. Moskova- Doumanova, S. Petrova, J. Doumanov, S. Rangelov,* **Nanoarchitectonics of different types of spherical nucleic acids: biological evaluation**, FEBS Open Bio, volume 13, 2023, doi:https://doi.org/10.1002/2211-5463.13646
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:001401044000397

Abstract

Spherical nucleic acids (SNAs) are nanostructures, consisting of a nanoparticle core densely grafted with strands of nucleic acids that form a shell surrounding the core. They have important role in different nucleic acid-containing formulations and possess a number of biological advantages such as: extraordinary stability in physiological environments and resistance to nuclease degradation; ability to penetrate cell membranes without using transfection agents; avoiding many biological barriers as well as the attack by the human immune system; possibilities to deliver specific molecular cargo and biomolecules; showing promising properties for intracellular diagnostics, cancer immunotherapy, and gene regulation. Here, we present the characteristics and biological evaluation of nanoarchitectonics based on different types of SNA. They were constructed by self-assembly of original hybrid biomacromolecules into vesicular (non-phospholipid nucleolipids [Previously published in: Dimitrov E et al (2022) Nanomaterials 12, 3645; Dimitrov E et al (2022) Nanoscale Adv. 4, 3793] and micellar SNA nanostructures [polymer-oligonucleotide conjugates (Previously published in: Kalinova R et al. (2022) Materials 15, 8917)]. The structures were tested for potential cytotoxic effects on a panel of cancer cell lines. They were found to exhibit the hallmark properties of SNAs—rapid cellular internalization without the need of transfection agents, enhanced colloidal and nuclease stability, loading capability for two or more payloads. The preliminary results obtained are optimistic for the potential biomedical application of the presented SNAbased nanoarchitectonics.

Резюме

Сферичните нуклеинови киселини (СНК) са наноструктури, състоящи се от ядро от наночастици, към което са гъсто присадени нишки от нуклеинови киселини, които образуват обвивка, обграждаща ядрото. СНК играят важна роля в различни формулировки, съдържащи нуклеинови киселини, и притежават редица биологични предимства, като например: изключителна стабилност във физиологични среди и устойчивост на разграждане от нуклеази; способност за проникване през клетъчни мембрани без използване на трансфекционни агенти; избягване на много биологични бариери, както и на атаката от човешката имунна система; възможности за доставяне на специфичен молекулярен товар и биомолекули; показват обещаващи свойства за вътреклетъчна диагностика, имунотерапия на рак и генна регулация. Тук представяме характеристиките и биологичната оценка на наноархитектониката, базирана на различни видове СНК. Те са конструирани чрез самосглобяване на оригинални хибридни биомакромолекули във везикуларни (нефосфолипидни нуклеолипиди [Преди това публикувано в: Dimitrov E et al (2022) Nanomaterials 12, 3645; Dimitrov E et al (2022) Nanoscale Adv. 4, 3793] и мицеларни SNA наноструктури [полимер-олигонуклеотидни конюгати (Преди това публикувано в: Kalinova R et al. (2022) Materials 15, 8917)]. Структурите са тествани за потенциални цитотоксични ефекти върху панел от ракови клетъчни линии. Установено е, че те проявяват отличителните свойства на SNA - бърза клетъчна интернализация без необходимост от трансфекционни агенти, подобрена колоидна и нуклеазна стабилност, способност за зареждане на два или повече полезни

товара. Получените предварителни резултати са оптимистични за потенциалното биомедицинско приложение на представената SNA-базирана наноархитектоника.

Г21. *K. Mladenova, J. Doumanov, S. Petrova, P. Videv, V. Moskova-Doumanova, T. Topouzova-Hristova, P. Bakardzhiev, N. Toncheva-Moncheva, S. Rangelov*, **Biological evaluation of novel amphiphilic nucleic acid – polymer nanoparticles in eukaryotic cells**, FEBS Open Bio 11 (Suppl. 1), 2021, pages:103-507, doi:https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/2211-5463.13205 *https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000668898601170*

Abstract

Polymer-based gene delivery systems are globally studied, as safer and less immunogenic substitutes to viral systems. However, as nucleic acids (NAs) are stable and hydrophilic molecules, and their intracellular delivery and targeting rely on secondary carriers. In this work we are presenting the biological effects of novel nucleic acid-polymer conjugates (NAPCs) on two cell lines – A549 and HepG2. NAPCs are composed by oligonucleotides functionalized with different polyethers such as poly(ethoxyethyl glycidyl ether) and polyesters such as poly(e-caprolactone). The NAPC assemblies were found to carry thousands of oligonucleotide strands per particle. Using MTT and crystal violet assays we investigate cytotoxicity of NAPCs applied on cells at different concentrations. The effect on cell viability was determined by incubating the cells for 48 h with nanoparticles in a concentration- dependent manner. NAPCs behavior into cells was investigated by microscopy observations after Neutral red staining and SYBR Green I staining (Previously published in: Bakardzhiev P et. al. (2020) European Polymer Journal, 131). Our results suggest that the biological properties of the NAPCs include low toxicity and rapid cellular uptake without the need of other transfection agents. We conclude that these novel NAPCs are promising carriers for the delivery of DNA with potential for biomedical applications.

Резюме

Системите за генна доставка на полимерна основа са обект на проучвания в световен мащаб, като по-безопасни и по-малко имуногенни заместители на вирусните системи. Тъй като обаче нуклеиновите киселини (NAs) са стабилни и хидрофилни молекули, тяхното вътреклетъчно доставяне и насочване разчита на вторични носители. В тази работа представяме биологичните ефекти на нови конюгати нуклеинова киселина-полимер (NAPCs) върху две клетъчни линии – A549 и HepG2. NAPCs са съставени от олигонуклеотиди, функционализирани с различни полиетери, като поли(етоксиетил глицидилов етер), и полиестери, като поли(е-капролактон). Установено е, че NAPC структурите носят хиляди олигонуклеотидни нишки на частица. Използвайки MTT-анализ и оцветяване с кристал виолет, изследвахме цитотоксичността на NAPCs, приложени върху клетки в различни концентрации. Ефектът върху клетъчната жизнеспособност бе определен чрез инкубиране на клетките в продължение на 48 часа с наночастици по концентрационно-зависим начин. Поведението на NAPC в клетките беше изследвано чрез микроскопски наблюдения след оцветяване с неутрално червено и оцветяване със SYBR Green I (публикувано преди това в: Bakardzhiev P et. al. (2020) European Polymer Journal, 131). Нашите резултати показват, че биологичните свойства на NAPC включват ниска токсичност и бързо клетъчно усвояване без необходимост от други трансфекционни агенти. Заключаваме, че тези нови NAPC са обещаващи носители за доставяне на ДНК с потенциал за биомедицински приложения.

Г22. *P. Bakardzhiev, N. Toncheva-Moncheva, K. Mladenova, S. Petrova, P. Videv, V. Moskova-Doumanova, T. Topouzova-Hristova,, J. Doumanov, S. Rangelov,* **Assembly of amphiphilic nucleic acid-polymer conjugates into complex superaggregates: Preparation, properties, and in vitro performance**, European Polymer Journal, vol:131, 2020
https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109692
https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85083336388&doi=10.1016%2fj.eurpolymj.2020.109692&partnerID=40&md5=96670407ba60eb12976de0411f8d40aa
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000532252800007

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 super aggregates 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 нуклеинова киселина-полимер (NAPC) се получават чрез клик-куплиращи реакции на подходящо функционализирани олигонуклеотиди със синтетични полимерни вериги с различна химическа природа, състав и свойства, а именно полиетери като поли(етоксиетил глицидилов етер) и полиестери като поли(ε-капролактон). Получените NAPC са амфифилни и образуват стабилни агрегати във воден разтвор. Агрегатите са обстойно изследвани чрез различни техники – статично, динамично и електрофоретично разсейване на светлината, трансмисионна електронна микроскопия и атомно-силова микроскопия. Размерът и моларните маси на частиците, както и други параметри като брой на агрегациите и брой на олигонуклеотидните вериги на частица, са значително по-големи от тези, докладвани за сферични нуклеинови киселини без метал. Очаква се образуването на суперагрегати от по-малки отделни мицели или немицеларни структури чрез хидрофобни взаимодействия между синтетичните полимерни вериги и „лепкави" взаимодействия между олигонуклеотиди, като например сдвояване на бази, π-подреждане, водородни връзки. „Лепкавите" взаимодействия се уравновесяват от отблъскване между отрицателно заредените олигонуклеотидни вериги, като по този начин се осигурява колоидна стабилност на

структурите. Повърхностната плътност на олигонуклеотидните нишки в обвивката предполага, че последните са в конформация на произволна спирала (гъба), а не в напълно разтегнат, четковиден режим. Отличителните свойства на прототипните сферични нуклеинови киселини – нетоксичност и биосъвместимост, повишено клетъчно усвояване без необходимост от трансфекционни агенти, подобрена нуклеазна стабилност – също се проявяват от новите конструкции, въпреки разликите в размера, морфологията и структурата.

Г23. *E. Haladjova, S. Halacheva, D. Momekova, V. Moskova-Doumanova, T. Topouzova-Hristova, K. Mladenova, J. Doumanov, M. Petrova, S. Rangelov,* **Polyplex Particles Based on Comb-Like Polyethylenimine/Poly(2-ethyl-2-oxazoline) Copolymers: Relating Biological Performance with Morphology and Structure**, Macromol. Biosci., 2018, ISSN (print):1616-5187, ISSN (online):1616-5195, doi:https://doi.org/10.1002/mabi.201700349
https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85042526632&doi=10.1002%2fmabi.201700349&partnerID=40&md5=6b7216607038e7f280a5cfcfe67eba8a
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000430395900003

Abstract

The present contribution is focused on feasibility of using comb-like copolymers of polyethylenimine with poly(2-ethyl-2-oxazoline) (LPEI-comb-PEtOx) with varying grafting densities and degrees of polymerization of PEI and PEtOx to deliver DNA molecules into cells. The copolymers form small and well-defined particles at elevated temperatures, which are used as platforms for binding and condensing DNA. The electrostatic interactions between particles and DNA result in formation of sub-100 nm polyplex particles of narrow size distribution and different morphology and structure. The investigated gene delivery systems exhibit transfection efficiency dependent on the copolymer chain topology, shape of the polyplex particles, and internalization pathway. Flow cytometry shows enhanced transfection efficiency of the polyplexes with elongated and ellipsoidal morphology. The preliminary biocompatibility study on a panel of human cell lines shows that pure copolymers and polyplexes thereof are practically devoid of cytotoxicity.

Резюме

Настоящият принос е фокусиран върху възможността за използване на гребеновидни съполимери на полиетиленимин с поли(2-етил-2-оксазолин) (LPEI-comb-PEtOx) с различна плътност на присаждане и степен на полимеризация на PEI и PEtOx за доставяне на ДНК молекули в клетките. Съполимерите образуват малки и добре дефинирани частици при повишени температури, които се използват като платформи за свързване и кондензиране на ДНК. Електростатичните взаимодействия между частиците и ДНК водят до образуването на полиплексни частици с размер под 100 nm с тясно разпределение на размера и различна морфология и структура. Изследваните системи за доставяне на гени показват ефективност на трансфекция, зависима от топологията на съполимерната верига, формата на полиплексните частици и пътя на интернализация. Флоуцитометрията показва повишена ефективност на трансфекция на полиплексите с удължена и елипсоидна морфология. Предварителното проучване за биосъвместимост върху панел от човешки клетъчни линии показва, че чистите съполимери и техните полиплекси са практически лишени от цитотоксичност.

Г24. *E. R. Haladjova, S. S. Halacheva, V. Posheva, E. Peycheva, V. Moskova-Doumanova, T. Topouzova-Hristova, J. Doumanov, S. M. Rangelov*, **Comb-like Polyethyleneimine-based Polyplexes: Balancing Toxicity, Cell Internalization, and Transfection Efficiency via Polymer Chain Topology**, Langmuir, vol:31, issue:36, 2015, pages:10017-10025, ISSN (print):0743-7463, doi:10.1021/acs.langmuir.5b02408
https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84941710714&doi=10.1021%2facs.langmuir.5b02408&partnerID=40&md5=1911f78b787716b9419ff4e51b781348
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000361415900032

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

Гребеновидни полиетиленимини с различна степен на полимеризация както на основните, така и на страничните вериги, както и с различна плътност на присаждане, бяха оценени като вектори за доставяне на гени. Те бяха способни да кондензират линейна и плазмидна ДНК в наноразмерни полиплексни частици с размери и повърхностни потенциали съответно в диапазоните 130−330 nm и −30 до +15 mV, в зависимост от съотношението амин/фосфат (N/P). Полиплексите оставаха стабилни във водни и буферни разтвори от няколко часа до няколко дни. Умерената колоидна стабилност се проявяваше и в относително широко разпределение на размерите (PDI обикновено над 0.2) и структурен полиморфизъм, наблюдаван чрез трансмисионна електронна микроскопия. Както чистите полимери, така и полиплексите показаха ниска цитотоксичност в WISH клетки, тъй като относителната клетъчна жизнеспособност беше повече от 60%. Експерименти с лизозомно флуоресцентно оцветяване разкриха, че пътищата на интернализация и, от своя страна, ефективността на трансфекция на полиплексните наночастици зависят от топологията на полимерната верига. Векторните системи, базирани на полимери с по-плътна структура, могат да се считат за обещаващи системи за генна трансфекция в еукариотни клетки.

Г25. *T. Topouzova-Hristova, J. Doumanov, D. Melnishka, K. Mladenova, V. Moskova-Doumanova, Z. Lalchev, T. Andreeva, E. Haladjova, S. Rangelov*, **Effects of novel gene delivery vector systems based on poly(vinyl benzyl trimethylammonium chloride) on A549 cell line**, FEBS journal , vol:282,

issue:S1, 2015, pages:282-282, ISSN (print):1742-464X, ISSN (online):1742-4658, doi:https://doi.org/10.1111/febs.13339
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000362570604141

Abstract

Polymer-based gene delivery systems are safer, less pathogenic and less immunogenic alternatives to viral systems. In this work we are focused on effects of novel homopolymers based on vinyl benzyl trimethylammonium chloride as gene delivery vector systems in a mode A549 human lung cancerous cell line. Cells are incubated with DNA/polymer complexes (polyplexes contain salmon sperm DNA) at a wide range of N/P (amino-to-phosphate groups) ratios and concentrations for 6 h. Using MTT assays, trypane blue and methylene blue staining, we investigate cytotoxicity of polyplexes, whereas their behaviour into cells during five days period was investigated by microscopy observations.

Using MTT assay, we found very low/non toxicity of both the pure polymer and polyplexes at various N/P ratios in the concentration range 5–50 μg/ml of. At the same time, a partial permeabilisation of cellular membranes was detected. Our results suggest absorption on the cell surface and entering of polyplexes into about 50% of the cells. Additionally, 48 h–72 h after treatment, the polyplexes showed movement out of the cells, probably forming exosomes. The cell number dramatically decreased and the cell morphology was affected. Our data suggest successful internalization of the studied polyplexes; however, they stay stable for several days into cytoplasm.

For delivery of DNA it is critical to develop less stable polymer particles. We conclude that these nanosized complexes are promise materials to transport biological molecules and particular for gene therapy for treating a wide range of diseases.

Резюме

Системите за доставяне на гени на базата на полимери са по-безопасни, по-малко патогенни и по-малко имуногенни алтернативи на вирусните системи. В тази работа се фокусираме върху ефектите на нови хомополимери, базирани на винилбензил триметиламониев хлорид, като векторни системи за доставяне на гени в човешката белодробна ракова клетъчна линия A549. Клетките бяха инкубирани с ДНК/полимерни комплекси (полиплексите съдържат ДНК от сперматозоиди от сьомга) в широк диапазон от съотношения и концентрации на N/P (амино-към-фосфатни групи) в продължение на 6 часа. Използвайки MTT анализи, оцветяване с трипаново синьо и метиленово синьо, изследвахме цитотоксичността на полиплексите, докато поведението им в клетките в продължение на пет дни беше изследвано чрез микроскопски наблюдения.

Използвайки MTT анализ, открихме много ниска токсичност/нетоксичност както на чистия полимер, така и на полиплексите при различни съотношения N/P в концентрационния диапазон 5–50 μg/ml. В същото време беше открита частична пермеабилизация на клетъчните мембрани. Нашите резултати показват абсорбция върху клетъчната повърхност и навлизане на полиплексите в около 50% от клетките. Освен това, 48–72 часа след третирането, полиплексите показаха движение извън клетките, вероятно образувайки екзозоми. Броят на клетките драстично намаля и клетъчната морфология беше засегната. Нашите данни показват успешна интернализация на изследваните полиплекси; те обаче остават стабилни в цитоплазмата в продължение на няколко дни.

За доставянето на ДНК е от решаващо значение да се разработят по-малко стабилни полимерни частици. Заключаваме, че тези наноразмерни комплекси са обещаващи материали за транспортиране на биологични молекули и са особено подходящи за генна терапия за лечение на широк спектър от заболявания.

Г26. *K. Kamenarova, S. Petrova, K. Mladenova, K. Mihova, M. Georgiev, N. Veleva, V. Moskova-Doumanova, P. Videv, J. Doumanov, R. Kaneva,* **Evaluation the effect of COL4A1R1656S mutation on the progressive retinopathy,** EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, 2025, ISSN (online): 1476-5438
https://doi.org/10.1038/s41431-025-01932-8
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:001671157903002

Background: Mutations in collagen type IV alpha 1 (COL4A1) are associated with multisystem abnormalities affecting mainly the brain and the retinal vasculature. We identified a pathogenic variant R1656S in COL4A1 in patients with retinopathy, anterior segment dysgenesis, and cataract, and aimed to evaluate the molecular effect of R1656S-mutation in MDCKII cells.

Material and methods: MDCKII cells were transiently and stably transfected using Effectene Transfection Reagen (Qiagen) with expression vectors containing WT COL4A1 and mutant R1656S along with GFP (pCMV-eGFP, Genecopea). ZO-1 (Tight junction protein) and GM-130 (Golgi marker) immunofluorescence, as well as TRITC-Phalloidin staining of actin cytoskeleton and cell nuclei with DAPI was performed on confluent cells.

Results: Using mammalian expression system based on transient and stably transfected MDCKII cells, we assessed the colocalization of F-actin cytoskeleton, ZO-1, GM-130, and COL4A1 proteins. No changes were found in cell morphology, ZO-1, GM130 and actin cytoskeleton structure but we observed differences in cell growth, mitotic index, and distribution of WT and R1656S-COL4A1. In cells expressing WT-COL4A1, its colocalization with F-actin filaments and ZO-1 close to the cell periphery was detected. This localization was less pronounced or absent in cells expressing R1656S-mutant. A strong signal for the COL4A1-R1656S was detected in close proximity to the Golgi apparatus.

Conclusion: Our findings explain the mixed phenotype of epithelial changes used as model system, which could be related to the retinal epithelial changes associated with optic nerve dysgenesis and secondary glaucoma observed in our patients, and suggest that carriers of COL4A1-R1656S may be at elevated risk of retinopathy.

Предистория: Мутациите в колаген тип IV алфа 1 (COL4A1) са свързани с мултисистемни аномалии, засягащи главно мозъка и ретиналната васкулатура. Идентифицирахме патогенен вариант R1656S в COL4A1 при пациенти с ретинопатия, дисгенеза на предния очен сегмент и катаракта и си поставихме за цел да оценим молекулярния ефект на R1656S-мутацията в MDCKII клетки.

Материали и методи: MDCKII клетки бяха преходно и стабилно трансфектирани с помощта на Effectene Transfection Reagen (Qiagen) с експресионни вектори, съдържащи WT COL4A1 и мутанта R1656S заедно с GFP (pCMV-eGFP, Genecopea). Имунофлуоресценция със ZO-1 (белтък на плътните контакти) и GM-130 (маркер за апарата на Голджи), както и оцветяване с TRITC-фалоидин на актиновия цитоскелет и клетъчните ядра с DAPI бяха извършени върху конфлуентни клетки.

Резултати: Използвайки експресионна система при бозайници, базирана на преходно и стабилно трансфектирани MDCKII клетки, ние оценихме колокализацията на F-актиновия цитоскелет, ZO-1, GM-130 и COL4A1 протеините. Не бяха открити промени в клетъчната морфология, ZO-1, GM130 и структурата на актиновия цитоскелет, но наблюдавахме разлики в клетъчния растеж, митотичния индекс и разпределението на WT и R1656S-COL4A1. В клетки, експресиращи WT-COL4A1, беше установена неговата колокализация с F-актинови филаменти и ZO-1 близо до клетъчната периферия. Тази локализация беше по-слабо изразена или липсваше в клетки, експресиращи R1656S-

мутант. Силен сигнал за COL4A1-R1656S беше открит в непосредствена близост до апарата на Голджи.

Заключение: Нашите открития обясняват смесения фенотип на епителните промени, използвани като моделна система, които биха могли да бъдат свързани с промените в ретиналния епител, дисгенезия на зрителния нерв и вторична глаукома, наблюдавани при нашите пациенти, и предполагат, че носителите на COL4A1-R1656S може да са с повишен риск от ретинопатия.

Г27*. J. Doumanov, A. Jordanova, K. Zlatkov, V. Moskova-Doumanova, Z. Lalchev,* **Investigation of IL-6 effects on SP-A expression in A549 lung cell line**, Biotechnology and Biotechnological Equipment, том:26, брой:1, 2012, стр.:96-99, ISSN (print):1310-2818, ISSN (online):1314-3530
https://doi.org/10.5504/50YRTIMB.2011.0018
https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84949803444&doi=10.5504%2f50YRTIMB.2011.0018&partnerID=40&md5=a22d61c169f62f8f3d09b80cc7d9fb7f
https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000209041200018

Abstract

Interleukin-6 (IL-6) is a multifunctional cytokine that is important in inflammatory processes, cell differentiation and growth.

Pulmonary surfactant is a protein-lipid complex, which reduce surface tension at the alveolar air-liquid interface, thereby preventing lung collapse. Surfactant protein A (SP-A) is the most abundant of four surfactant proteins (SP-A, SP-B, SP-C and SP-D). It binds to alveolar macrophages, stimulates their chemotaxis and serves as an opsonin in the phagocytosis.

Low SP-A levels are associated with increased inflammation in the lung. In the absence of infection SP-A inhibited IL-6 production. In infected macrophages, SP-A augmented IL-6 production. In humans, SP-A levels are altered by a number of disease states. In some of them there is increased levels of SP-A in the bronchoalveolar lavage fluid.

Here we investigate presence/absence of correlation between increased levels of IL-6 and production of SP-A from A549 lung cell line. Our results suggest that incubation of A549 cells with IL-6 for different time changes significantly the expression levels of SP-A.

Резюме

Интерлевкин-6 (IL-6) е многофункционален цитокин, който е важен за възпалителните процеси, клетъчната диференциация и растежа.

Белодробният сърфактант е протеин-липиден комплекс, който намалява повърхностното напрежение на алвеоларната граница въздух-течност, като по този начин предотвратява белодробния колапс. Сърфактантният протеин А (SP-A) е най-разпространеният от четирите сърфактантни протеина (SP-A, SP-B, SP-C и SP-D). Той се свързва с алвеоларните макрофаги, стимулира техния хемотаксис и служи като опсонин при фагоцитозата. Ниските нива на SP-A са свързани с повишено възпаление в белия дроб. При липса на инфекция SP-A инхибира производството на IL-6. В инфектираните макрофаги SP-A увеличава производството на IL-6. При хората нивата на SP-A се променят от редица болестни състояния. При някои от тях има повишени нива на SP-A в бронхоалвеоларната лаважна течност.

Тук изследваме наличието/липсата на корелация между повишените нива на IL-6 и производството на SP-A от белодробна клетъчна линия A549. Нашите резултати показват, че инкубацията на A549 клетки с IL-6 за различно време променя значително нивата на експресия на SP-A.

Г28. *I. Audo, K. Bujakowska, C. M. Poloschek, S. Defoort-Dhellemmes, I. Drumare, S. Kohl, E. Zrenner, E. Orhan, V. Moskova-Doumanova, et al.,* **Erratum: Whole-exome sequencing identifies mutations in GPR179 leading to autosomal-recessive complete congenital stationary night blindness (American Journal of Human Genetics (2012) 90 (321-330))**, American Journal of Human Genetics , том:91, брой:1, 2012, стр.:209-209, ISSN (print):0002-9297, ISSN (online):1537-6605, doi:https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.06.001 https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84863968689&doi=10.1016%2fj.ajhg.2012.06.001&partnerID=40&md5=d3111a61d78361f647a20687cf2577ee

(The American Journal of Human Genetics 90, 321–330; February 10, 2012)

In the original version of this report, which describes GPR179 mutations in patients with complete congenital stationary night blindness, we applied an antibody against human GPR179 to mouse retinal sections and concluded that GPR179 was localized to horizontal cells and Müller cell endfeet (Figure 4). We have since discovered that this use of the antibody does not result in specific labeling. Our recent results support the conclusion of the parallel study of Peachey et al.,[1] which concluded that GPR179 is expressed in retinal bipolar cells.

В оригиналната версия на този доклад, който описва мутациите на GPR179 при пациенти с пълна вродена непрогресивна нощна слепота, ние приложихме антитяло срещу човешки GPR179 върху срези от ретина на мишки и заключихме, че GPR179 е локализиран в хоризонтални клетки и краища на клетките на Мюлер (Фигура 4). Оттогава открихме, че това използване на антитялото не води до специфично маркиране. Нашите скорошни резултати подкрепят заключението на паралелното проучване на Peachey et al.,[1] което заключи, че GPR179 се експресира в биполярни клетки на ретината.