

Резюмета

на

рецензираните публикации на доц. д-р Йордан Атанасов Думанов участващи в конкурс за „професор“ обявен в ДВ бр. 32/16.04.2021 г.

Summaries

on

the peer-reviewed publications of Assoc. Prof. Dr. Jordan Atanassov Doumanov submitted for participation in a competition for the academic position of “Professor” announced in SG, issue 32, p. 168 of 16.04.2021

1. Kirilka Mladenova, Svetla D. Petrova, Tonya D. Andreeva, Veselina Moskova-Doumanova, Tanya Topouzova-Hristova, Yuri Kalvachev, Konstantin Balashev, Shomi S. Bhattacharya, Christina Chakarova, Zdravko Lalchev, **Jordan A. Doumanov**, Effects of Ca^{2+} ions on bestrophin-1 surface films, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017, 149 (2017) 226–232, **IF 3.902, Q1, SJR 1.071**

Summary

Human bestrophin-1 (hBest1) is a transmembrane calcium-activated chloride channel protein – member of the bestrophin family of anion channels, predominantly expressed in the membrane of retinal pigment epithelium (RPE) cells. Mutations in the protein cause ocular diseases, named Bestrophinopathies. Here, we present the first Fourier transform infrared (FTIR) study of the secondary structure elements of hBest1, π/A isotherms and hysteresis, Brewster angle microscopy (BAM) and atomic force microscopy (AFM) visualization of the aggregation state of protein molecules dispersed as Langmuir and Langmuir-Blodgett films. The secondary structure of hBest1 consists predominantly of β_{10} -helices (27.2%), α -helices (16.3%), β -turns and loops (32.2%). AFM images of hBest1 suggest approximate lateral dimensions of $100 \times 160 \text{ \AA}$ and 75 \AA height. Binding of calcium ions (Ca^{2+}) induces conformational changes in the protein secondary structure leading to assembly of protein molecules and changes in molecular and macro-organization of hBest1 in monolayers. These data provide basic information needed in pursuit of molecular mechanisms underlying retinal and other pathologies linked to this protein.

Резюме

Човешкият бестрофин-1 (hBest1) е трансмембранен калциево-зависим хлорен канал - член на семейството на бестрофиновите анионни канали, експресиран предимно в мембраната на клетките на ретиналния пигментен епител (retinal pigment epithelium)

RPE, РПЕ). Мутациите в протеина причиняват очни заболявания, наречени бестрофинопатии. Тук, представяме първото изследване на инфрачервената спектроскопия с трансформация на Фурие (Fourier transform infrared, FTIR), на елементите на вторичната структура на hBest1, π/A изотерми и хистерезис, Брюстер ъглова микроскопия (Brewster angle microscopy, BAM) и атомна силова микроскопия (atomic force microscopy, AFM) на агрегираното състояние на диспергираните протеинови молекули в Лангмюир и Лангмюир-Блоджетови филми. Вторичната структура на hBest1 се състои предимно от β_{10} -спирали (27.2%), α -спирали (16.3%), β -извивки и бримки (32.2%). AFM изображенията на hBest1 показват приблизителни странични размери от $100 \times 160 \text{ \AA}$ и височина 75 \AA . Добавянето на калциеви йони (Ca^{2+}) предизвиква конформационни промени във вторичната структура на протеина, което води до асоциирането на протеинови молекули и промени в молекулярната и макроорганизацията на монослоевите от hBest1. Тези данни представят основна информация, необходима за изследване на молекулярните механизми, свързани с ретината и другите патологии определени от този протеин.

2. K. Mladenova, S. Petrova, T. Andreeva, V. Moskova-Doumanova, Z. Lalchev, **J. Doumanov**, Effect of Ca^{2+} ions on Bestrophin-1 interaction with 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine in surface films, *FEBS journal suppl.*, 2015, Volume 282, p. 319, Supplement 1, **IF 4.53, Q1, SJR 2.152**

Summary

Bestrophin-1 (Best1) is a transmembrane channel protein, predominantly expressed in the plasma membrane of retinal pigment epithelium (RPE). Best1 is a multifunctional protein that may acts as a Ca^{2+} -activated chloride channel or/and regulator of voltage-gated Ca^{2+} channels. The channel participates not only in the transport of ions (such as Cl^-), but also of organic molecules, such as γ -aminobutyric acid (GABA) in glial cells and glutamate in astrocytes and neurons.

Although the structure of Best1 is still uncertain, it is clear that its interactions with the plasma membrane lipids are important for the conformation, oligomerization and functional activity. Therefore, the knowledge of Best1 interactions with biorelevant lipids is of major importance. Such studies have not been performed so far as the protein was not purified to homogeneity. For the first time, our group published an original methodology for isolation and purification of sufficient quantities of functionally active human recombinant Best1 from stably transfected MDCK cells, enabling this research.

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 канален протеин, който е експресиран в плазмената мембрана на пигментния епител на ретината (РПЕ). Best1 е мултифункционален протеин, който може да действа като Ca^{2+} - зависим хлорен канал или/и регулатор на Ca^{2+} канали. Каналът участва не само в транспорта на Cl^- йони но и на органични молекули, като γ -аминомаслена киселина (GABA) в глиални клетки и глутамат в астроцити и неврони. Въпреки че структурата на Best1 все още е неизяснена, то неговите взаимодействия с липидите на плазмената мембрана са важни за конформацията, олигомеризацията и функционалната активност. Следователно познаването на взаимодействията на Best1 с биорелевантни липиди е от голямо значение. Такива проучвания не бяха провеждани, доколкото протеинът не беше пречистен до хомогенност. За първи път нашата група публикува оригинална методология за изолиране и пречистване на достатъчно количество функционално активен човешки рекомбинантен Best1 от стабилно трансфектирани MDCK клетки, което позволи това изследване. Нашият интерес беше фокусиран върху ефекта от Ca^{2+} йони върху взаимодействията на Best1 с 1-палмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine, POPC) в Лангмюрови монослое, защото това е най-разпространеният фосфолипид в мембраните на животинските клетки. Изотермите π/A (повърхностно налягане/площ) и хистерезисите на компресия/разширение на монослоеве Best1, POPC и Best1/POPC бяха определени в отсъствие и присъствие на Ca^{2+} . Ефектът на Ca^{2+} върху морфологията на монослоеве беше наблюдаван чрез Брюстер ъглова микроскопия (BAM). Нашето проучване показва, че включването на Ca^{2+} в подфазата на монослоя не променя формата на π/A изотермите, но намалява средната молекулна площ на Best1, POPC и Best1/POPC монослоеве. Тези резултати корелират добре с BAM изображения, показващи, че присъствието на Ca^{2+} индуцира образуването на липид-протеинови макромолекулни агрегати (Best1-POPC кълъстери) по време на компресия на монослоеве. Ние предполагаме, че Ca^{2+} йони играят роля за взаимодействията на Best1 с POPC при физиологични условия в клетката.

3. Tonya D. Andreeva, Svetla D. Petrova, Kirilka Mladenova, Veselina Moskova-Doumanova, Tanya Topouzova-Hristova, Yulia Petseva, Nikola Mladenov, Konstantin Balashev, Zdravko Lalchev, **Jordan A. Doumanov**, Effects of Ca^{2+} , Glu and GABA on hBest1 and composite hBest1/POPC surface films, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2018, 161, 192–199, **IF 4.295, Q1, SJR 0.957**

Summary

Bestrophinopathies are ocular diseases caused by mutations in the human bestrophin-1 (hBest1) – trans-membrane 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, POPC) 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 протеин, Ca^{2+} активиран от хлорен канал, експресиран главно в клетките на ретиналния пигментен епител (РПЕ). hBest1 е също важен транспортер за невротрансмитери като глутамат (Glu) и γ -аминомаслена киселина (GABA) в нервната система. Напоследък се предлага нова биологична роля на hBest1, свързана с възможното му участие в патологията на заболявания на мозъка (като болестта на Алцхаймер, болестта на Паркинсон). Тук съобщаваме за ефектите на Ca^{2+} , Glu и GABA върху hBest1 и смесени hBest1/POPC (1-палмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин, 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, POPC) Лангмюирови и Лангмюир-Блоджетови монослоеви въз основа на повърхностната динамика (чрез π/A изотерми и хистерезиси), морфология (чрез Брюстер ъглова микроскопия, BAM) и визуализация на белтъчната молекулярна организация (чрез атомна силова микроскопия, AFM). Ca^{2+} йони и невротрансмитерите Glu и GABA влияят на hBest1 топологията на фазовата граница въздух/вода, променяйки неговата повърхностна активност, размер, ориентация и организация. За разлика от „чистия“ hBest1, не са открити значителни промени на π/A изотермите и хистерезисите при смесените hBest1/POPC филми, но са установени разлики в ефектите на Ca^{2+} , Glu и GABA върху структурата, агрегационното състояние и ориентацията hBest1 (чрез BAM и AFM). Установихме, че бинарните hBest1/POPC филми са фазово разделени на границата въздух/вода, което предполага по-силни липид-липидни и протеин-протеинови взаимодействия в сравнение с липид-протеиновите взаимодействия, които могат значително да променят молекулярната организация и активност на hBest1 в клетъчните

мембрани. Нашите резултати хвърлят светлина върху структурата, повърхностното поведение и организацията на hBest1, които определят връзката структура - функционалната активност на hBest1 като транспортен канал.

4. Nikola Mladenov, Svetla D. Petrov, Kirilka Mladenov, Desislava Bozhinov, Veselina Moskova-Doumanov, Tanya Topouzova-Hristov, Pavel Videv, Ralitsa Veleva, Aneliya Kostadinov, Galya Stanev, Tonya D. Andreev, **Jordan A. Doumanov**, Miscibility of hBest1 and sphingomyelin in surface films – A prerequisite for interaction with membrane domains, 2020, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 189, 110893 , **IF 3.973**, **Q1**, SJR 0.957

Summary

Human bestrophin-1 (hBest1) is a transmembrane Ca^{2+} - dependent anion channel, associated with the transport of Cl^- , HCO_3^- ions, γ -aminobutyric 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 (L_o) and liquid-disordered (L_d) fractions, quantifying protein association up to 35 % and 65 % with L_o and L_d . 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 регулиране на хомеостазата на ретината. Неговите мутантни форми причиняват дегенеративни заболявания на ретината, дефинирани като бестрофинопатии. Чрез използване, както на физикохимични - повърхностно налягане/средна молекулна площ (π/A) изотерми, хистерезиси, модули за свиваемост на hBest1/сфингомиелин (SM) монослое, изследвания чрез Брюстер ъгловата микроскопия (Brewster angle microscopy, BAM) и биологични подходи - мембранно фракциониране с детергенти, оцветяване с Лаурдан (6-додеканоил-*N,N*-диметил-2-нафтиламин, 6-dodecanoyl-*N,N*-dimethyl-2-naphthylamine, Laurdan) и имуофлуоресцентно оцветяване на стабилно трансфектирани MDCK-hBest1 и MDCK II клетки, показахме че: 1) Ca^{2+} , Glu и GABA взаимодействат с бинарни hBest1/SM монослое при 35 ° C, което води до промени в hBest1 повърхностната конформация, структура, самоорганизация и повърхностната

динамика. Процесът на смесване в hBest1/SM монослоеве е спонтанен и ефектът на протеина върху бинарни филми се определя като „флуидизиращ“, възпрепятстващ фазовия преход на монослоя от течно - разтегнато към междинно състояние (LE-M); 2) в стабилно трансфектирани MDCK-hBest1 клетки бестрофин-1 се разпределя между детергент резистентни (detergent resistant membranes, DRM) и детергент разтворими мембрани (detergent-soluble membranes DSM) - съответно до 30% и 70%; в живи клетки hBest1 се визуализира, както в течно-подредените (liquid-ordered, L_o), така и в течно неподредените (liquid-disordered, L_d) фракции, като количествено се асоциира до 35% с L_o и 65% с L_d. Нашите резултати показват, че спонтанната смесваемост на hBest1 и SM е предпоставка за различни протеинови взаимодействия с мембранни домени, различни структурни конформации и биологични функции.

5. **Jordan Doumanov**, Kirilka Mladenova, Tanya Topouzova-Hristova, Stoyanka Stoitsova, Svetla Petrova, Effects of vipoxin and its components on HepG2 cells, *Toxicon*, 2015, 94 36-44, **IF 2.581**, **Q2**, SJR 0.904

Summary

Snake venom Phospholipases A₂ (svPLA₂) are among the main toxic venom components with a great impact on different tissues and organs based on their catalytic specificity and a variety of pharmacological effects, whose mechanism is still under debate. The main toxic component, isolated from the venom of *Vipera ammodytes meridionalis*, is the heterodimeric postsynaptic ionic complex vipoxin, composed of a basic and toxic PLA₂ enzyme subunit (GIIA secreted PLA₂) and an acidic, enzymatically inactive and nontoxic subunit e vipoxin acidic component (VAC). This study demonstrates for the first time that vipoxin and its individual subunits affect integrity and viability of HepG2 cells displaying differences in their pharmacological activities. Under the experimental conditions, the individual PLA₂ subunit induces cytotoxicity, cytoskeletal rearrangements and triggers early apoptosis in a concentration-dependent manner related to its enzymatic activity. Vipoxin and VAC do not affect cell viability but manifest high degree of genotoxicity, whereas DNA damage induced by PLA₂ subunit could be defined as moderate and not associated with its catalytic activity. Our results suggest that the interactions between vipoxin subunits play an important role in HepG2 cell response and most likely affect the observed distinction between cyto- and genotoxicity.

Резюме

Фосфолипазите A₂ (svPLA₂) от змийската отрова са сред основните токсични компоненти с голямо въздействие върху различни тъкани и органи въз основа на тяхната каталитична специфичност и разнообразие от фармакологични ефекти, чийто механизъм все още под дискусия. Основният токсичен компонент, изолиран от отровата на *Vipera ammodytes meridionalis*, е хетеродимерният постсинаптичен йонен комплекс випоксин, съставен от основната и токсична ензимната субединица PLA₂ (GIIA секретира PLA₂) и киселата, ензимно неактивна и нетоксична субединица випоксинен киселинен компонент (vipoxin acidic component, VAC). Това проучване показва за първи път, че випоксинът и неговите отделни субединици влияят върху целостта и жизнеспособността на HepG2 клетките, показвайки различия във фармакологичните им дейности. При експерименталните условия, отделната PLA₂

субединица индуцира цитотоксичност, цитоскелетни пренареждания и предизвиква ранна апоптоза по зависим от концентрацията начин, което е свързано с нейната ензимна активност. Випоксинът и VAC не оказват влияние върху жизнеспособността на клетките, но проявяват висока степен на генотоксичност, докато увреждането на ДНК, индуцирано от PLA₂ субединицата е умерено и може да не е свързано с неговата каталитична активност. Нашите резултати показват, че взаимодействията между випоксиновите субединици играят важна роля в клетъчния отговор на HepG2 и най-вероятно засягат наблюдаваното разграничение между цито- и генотоксичност.

6. **J. Doumanov**, K. Mladenova, T. Topouzova-Hristova, I. Ivanova, S. D. Petrova, Influence of snake venom Phospholipase A₂ on RPE-1 cells – multiple biological roles of sPLA₂, *FEBS journal suppl.*, 2015, Volume 282, p. 223, Supplement 1, **IF 4.53, Q1, SJR 2.152**

Summary

Secreted phospholipases A₂ (sPLA₂, EC 3.1.1.4) catalyse the hydrolysis of the 2-acyl ester bond of 1,2-diacyl-3-sn-phosphoglycerides in a calcium-dependent manner, releasing functional activity acting as potent lipid mediators involved in membrane damaging, cell proliferation, inflammation and apoptosis.

Snake venom sPLA₂ represent a family of structurally related enzymes that affect different type of tissues and provoke neurotoxicity, myotoxicity, cardiotoxicity, anticoagulant effects, nephrotoxicity, hepatotoxicity, platelet aggregation, hemolytic activity, inflammation, and etc.

Our interest has been focused on the toxic effects of snake venom sPLA₂ on retinal pigment epithelium (RPE). RPE cells play a key role in phagocytosis of photoreceptor outer segment membranes, absorption of light, visual cycle, secretion, epithelial transport (homeostasis), etc. To shed light on the influence of neurotoxic sPLA₂ on RPE cell metabolism and proliferation, we investigate the effects of vipoxin sPLA₂ subunit on RPE-1 model cell line. Vipoxin is the main neurotoxin in the venom of *Vipera ammodytes meridionalis* snake (endemic to some arias of the Balkans). It is a heterodimeric protein composed of a basic and toxic GIIA sPLA₂ subunit (Mr 13828 Da, pI 10.4) and an acidic, enzymatically inactive and nontoxic subunit (Mr 13639 Da, pI 4.6) associated spontaneously in a tight 1:1 complex by multiple non-covalent bonds and additionally stabilized by electrostatic interactions. Separation of vipoxin subunits was performed using cation-exchange chromatography on Mono S FPLC column and their homogeneity was assessed by SDS PAGE.

We use MTT and comet assays to elucidate cyto- and geno- toxicity, and actin fluorescence staining to detect cytoskeleton rearrangements induced by pure toxic sPLA₂.

Our results suggest changes in cell metabolic activity, dramatic actin cytoskeleton rearrangement in RPE-1 cells and generation of double-strand DNA brakes. We assume that the products of sPLA₂ enzymatic activity have their own impact and affect also cell survival pathways.

Резюме

Секретираните фосфолипази A₂ (sPLA₂, EC 3.1.1.4) катализират хидролизата на 2-ациловата естерна връзка на 1,2-диацил-3-*sn*-фосфоглицериди по зависим от калция

начин, освобождавайки мощни липидни медиатори, участващи в увреждане на мембраната, клетъчна пролиферация, възпаление и апоптоза. sPLA₂ от змийска отрова е от семейството структурно свързани ензими, които засягат различни видове тъкани и провокират невротоксичност, миотоксичност, кардиотоксичност, антикоагулантни ефекти, нефротоксичност, хепатотоксичност, агрегация на тромбоцитите, хемолитична активност, възпаление и др. Нашият интерес е фокусиран върху токсичните ефекти на змийската отрова sPLA₂ върху ретиналния пигментен епител (retinal pigment epithelium, RPE). Клетките на RPE играят ключова роля във фагоцитозата на мембраните на външния сегмент на фоторецепторите, абсорбцията на светлина, зрителния цикъл, секрецията, епителния транспорт (хомеостаза) и др. За да хвърлим светлина върху влиянието на невротоксичната sPLA₂ върху метаболизма и пролиферацията на RPE клетките, ние изследвахме ефектите на випоксиновата sPLA₂ субединица върху RPE-1 моделната клетъчна линия. Випоксинът е основният невротоксин в отровата на змията *Vipera ammodytes meridionalis* (ендемит за някои региони на Балканите). Това е хетеродимерен протеин, съставен от основна и токсична субединица GIIA sPLA₂ (Mr 13828 Da, pI 10.4) и кисела, ензимно неактивна и нетоксична субединица (Mr 13639 Da, pI 4.6), спонтанно асоциирана в здрав 1:1 комплекс от множество нековалентни връзки и допълнително стабилизирана чрез електростатични взаимодействия. Разделянето на випоксиновите субединици се извършваше с помощта на катионообменна хроматография върху Mono S FPLC колона и тяхната хомогенност се определяше чрез SDS PAGE.

Използвахме МТТ и „кометни“ тестове за да определим цито- и гено-токсичността и чрез флуоресценция на актин, за да открием пренареждане на цитоскелета, индуцирани от токсичната sPLA₂.

Нашите резултати показват промени в метаболитната активност на клетките, драматично пренареждане на актиновия цитоскелет в RPE-1 клетките и генериране на двуверижни ДНК „скъсвания“. Предполагаме, че продуктите на ензимната активност на sPLA₂ имат също свое собствено въздействие и засягат пътищата на клетъчния растеж.

7. Haladjova E, Halacheva S, Posheva V, Peycheva E, Moskova-Doumanova V, Topouzova-Hristova T, **Doumanov J**, Rangelov S. , Comblike Polyethylenimine-Based Polyplexes: Balancing Toxicity, Cell Internalization, and Transfection Efficiency via Polymer Chain Topology, *Langmuir*. 2015, Sep 15;31(36):10017-25, **IF 4.457**, **Q1**, SJR 1.650

Summary

Comblike polyethylenimines with varying degrees of polymerization of both the main and side chains as well as different grafting densities were evaluated as gene 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

Гребеноподобните полиетиленимици с различна степен на полимеризация, както на основната, така и на страничните вериги, както и с различна им плътност бяха изследвани като генетични носители (вектори). Те могат кондензират линейна и плазмидна ДНК в наноразмерни полиплексни частици с размер и повърхностен потенциал, съответно в диапазоните 130-330 nm и -30 до +15 mV, в зависимост от съотношението амин/фосфат (N/P). Полиплексите остават стабилни във водни и буферни разтвори от няколко часа до няколко дни. Умерената колоидна стабилност също се проявява в относително широко разпределение на размерите (PDI обикновено над 0,2) и структурен полиморфизъм, наблюдаван чрез трансмисионна електронна микроскопия. Както чистите полимери, така и полиплексите показват ниска цитотоксичност в WISH клетки, тъй като относителната жизнеспособност на клетките е повече от 60%. Експериментите с лизозомно флуоресцентно оцветяване показват, че пътищата за интернализация и ефективността на трансфекция на полиплексните наночастици зависят от топологията на полимерната верига. Векторните системи, базирани на полимерите с по-плътна структура, могат да се считат за обещаващи системи за генна трансфекция в еукариотни клетки.

8. Kostadinova, A., J. Dumanov, D. Moyankova, S. Ivanov, K. Mladenova, D. Djilianov, T. Topouzova-Hristova, *Haberlea rhodopensis* extracts affect cell periphery of keratinocytes, *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, 2016, Tome 69, Number 4, pages 439- 448, IF 0.233, Q3, SJR 0.209

Summary

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

Резюме

Общите черти на хроничните дерматологични състояния са свързани с възпаление и ROS (Reactive oxygen species), както и нарушения в клетъчната пролиферация и диференциация. Нашата цел беше да изследваме въздействието на екстрактите на *Haberlea rhodopensis* върху митохондриалната активност, целостта на клетъчните мембрани, актиновия цитоскелет и здравите механични връзки (свързани със загубата

на ZO-1) на човешки кератиноцити (HaCaT клетки). Бяха проведени тестове за цитотоксичност като MTS, LDH и анализ на изключване на трипаново синьо, за да се оцени метаболитната активност и мембранната пропускливост на клетките. В концентрации до 2 mg/ml екстрактите влияят на клетъчната периферия, проникват в мембраната и нарушават механичните контакти на HaCat кератиноцитите, което е силно изразено при активно делящи се клетки (-Ca + клетки). Нашите резултати показват, че екстрактите от *Haberlea rhodopensis* могат да бъдат добър кандидат за използване при комплексно лечение на патологични дерматологични състояния.

9. Kalinova, R., **Doumanov, J.**, Mladenova, K., Janevska, D.; Georgieva, M., Miloshev, G., Topouzova-Hristova, T., Dimitrov, I., Rational design of polypeptide-based block copolymer for nonviral gene delivery. 2017, *ChemistrySelect*, 2, 12006 –12013, **IF 1.505**, **Q2**, SJR 0.445

Summary

The present work describes the development, characterization, and *in vitro* evaluation of novel poly(L-lysine)-based polyplexes as nonviral gene delivery systems. Initially, a well-defined hybrid block copolymer comprising poly(ethylene glycol) methacrylate (POEGMA) and poly(L-lysine) (PLL) blocks was successfully synthesized and characterized. The hybrid copolymer shows high ability to condense DNA into stable polyplexes in aqueous media with sizes of approx. 100 nm. The nanoplexes were evaluated for cellular toxicity in A549 alveolar and HepG2 (hepatocarcinoma) cell lines. The nanoparticles cell internalization and transfection ability were assessed in HepG2 cells. The initial experiments showed that DNA was successfully transfected into the nucleus of human liver cancer cells and expressed enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene with green fluorescence emission. These results revealed that the newly synthesized POEGMA-b-PLL diblock copolymer might be very attractive candidate as a nonviral gene delivery vector.

Резюме

Настоящата работа описва разработването, характеризирането и оценката *in vitro* на новите поли (L-лизин) базирани полиплекси като невирусни системи за доставка на гени. Първоначално беше добре дефиниран, синтезиран и охарактеризиран хибриден блок-кополимер, съдържащ поли (етилен гликол) метакрилат (POEGMA) и поли (L-лизин) (PLL) комплекси (блокове). Хибридният кополимер показва висока способност да кондензира ДНК в стабилни полиплекси във водна среда с размери приблизително 100 nm. Беше определена клетъчна токсичност на наноплексите в клетъчни линии A549 (алвеоларни) и HepG2 (хепатокарциномни). Клетъчната интернализация на наночастиците и способността за трансфекция бяха изследвани в HepG2 клетки. Първоначалните експерименти показаха, че ДНК е била успешно трансфектирана в човешки ракови клетки на черния дроб, където експресира ген на зеления флуоресцентен протеин (EGFP). Тези резултати показаха, че новосинтезираният POEGMA-b-PLL диблоков кополимер може да бъде много добър кандидат като невирусен вектор за доставка на генетична информация.

10. Emi Haladjova., Mariya Kyulavska, **Jordan Doumanov**, Tanya Topouzova-Hristova, Petar Petrov, Polymeric vehicles for transport and delivery of DNA via cationic micelle

Summary

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

Резюме

Тези изследвания описват подготовката на полимерна невирусна система за транспорт и доставка на нуклеинови киселини. Амфифилен поли (2-(диметиламино) етил метакрилат)-блок-поли (ε-капролактон)-блок-поли (2-(диметиламино) етилметакрилат) (PDMAEMA20-b-PCL70-b-PDMAEMA20) триблоков кополимер беше синтезиран и използван за образуване на катионни мицели и последващо комплексиране с ДНК. беше проведено защитно полимерно покритие върху повърхността и отстраняване на съполимера от вътрешността на частиците. По този начин бяха получени полимерни нанокapsули, съдържащи ДНК молекули. Синтезираният полимер, катионните мицели, комплекси и полимерни капсули бяха изследвани чрез ядрено-магнитен резонанс, гел проникваща хроматография, динамично и електрофоретично разсейване на светлината и трансмисионна електронна микроскопия. In vitro оценката на цитотоксичността на различните системи показва много добра толерантност към човешки еукариотни клетки.

11. Haladjova, E.; Halacheva, S.; Momekova, D.; Moskova-Doumanova, V.; Topouzova-Hristova, T.; Mladenova, K.; **Doumanov, J.**; Petrova, M.; Rangelov, S., Polyplex Particles based on Comb-Like Polyethylenimine/Poly(2-ethyl-2-oxazoline) Copolymers: Relating Biological Performance with Morphology and Structure. *Macrom. Biosci.* – submitted October 2017; ISSN 1616-5195, accepted December 2017, Apr;18(4):e1700349, doi: 10.1002/mabi.201700349. Epub 2018, Feb 28, **IF 3.238, Q1, SJR 1.017**

Summary

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

Настоящата работа е фокусирана върху възможността за използване на гребеновидни съполимери на полиетиленимин с поли (2-етил-2-оксазолин) (LPEI-comb-PEtOx) с различна плътност и степени на полимеризация на PEI и PEtOx за доставяне на ДНК в клетки. 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 образуване на полиплексни частици под 100 nm с тясно разпределение на размера, различна морфология и структура. Изследваните системи за генно доставяне показват ефективност на трансфекция в зависимост от топологията на съполимерната верига, формата на полиплексните частици и пътя на интернализация. Flow cytometry 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 не са цитотоксични.

12. Antoaneta Trendafilova, Victoria Ivanova, Miroslav Rangelov, Milka Todorova, Gulmira Ozek, Suleyman Yur, Temel Ozek, Ina Aneva, Ralitzia Veleva, Veselina Moskova-Doumanova, **Jordan Doumanov**, and Tanya Topouzova-Hristova, Caffeoylquinic Acids, Cytotoxic, Antioxidant, Acetylcholinesterase and Tyrosinase Enzyme Inhibitory Activities of Six *Inula* Species from Bulgaria, 2020, *Chem. Biodiversity*, 17, e2000051, DOI: 10.1002/cbdv.202000051, **IF 1.449, Q2, SJR 0.440**

Summary

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

Хлорогенните (5-CQA), 1,5-, 3,5-, 4,5- и 3,4-дикафеоилхиновите (DCQA) киселини са идентифицирани и количествено определени в метаноловите екстракти от *Inula oculus-christi* L., *I. bifrons* L., *I. aschersoniana* JANKA var. *aschersoniana*, *I. ensifolia* L., *I. conyza* (GRIESS.) DC. и *I. germanica* L. чрез HPLC анализ. Количеството на 5-CQA варира от 5.48 до 28.44 mg/g DE и най-високото съдържание е бeше установено при *I. ensifolia*. 1,5-DCQA (4,05-55,25 mg/g DE) е най-разпространеният дикафеоилов естер на хининовата киселина, последван от 3,5-DCQA, 4,5-DCQA и 3,4-DCQA. Екстрактът от *I. ensifolia* показва най-високото общо фенолно съдържание ($119,92 \pm 0,95$ mg GAE/g DE) и проявява най-силната активност за отстраняване на DPPH радикали ($69,41 \pm 0,55\%$). Беше установено е, че екстрактът от *I. bifrons* е най-активната проба срещу ABTS * + (TEAC $0,257 \pm 0,012$ mg / ml) и най-добрият инхибитор на тирозиназата. Изследваните екстракти показват нисък инхибиторен ефект спрямо ацетилхолинестеразата и притежават ниска цитотоксичност в концентрационен диапазон от 10 до 300 $\mu\text{g/ml}$ спрямо неракови (MDCK II) и ракови (A 549) клетки.

13. Pavel Bakardzhiev, Natalia Toncheva-Moncheva, Kirilka Mladenova, Svetla Petrova, Pavel Videv, Veselina Moskova-Doumanova, Tanya Topouzova-Hristova, **Jordan Doumanov** and Stanislav Rangelov, Assembly of Amphiphilic Nucleic Acid–Polymer Conjugates into Complex Superaggregates: Preparation, Properties, and in vitro Performance, 2020, *European Polymer Journal*, Volume 131, 15 May 2020, 109692, **IF 3.621**, **Q1**, SJR 0.967

Summary

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

Резюме

Нуклеиново киселинно-полимерни конюгати (Nucleic acid-polymer conjugates, NAPCs) се получават чрез „click coupling“ реакции на подходящо функционализирани олигонуклеотиди със синтетични полимерни вериги с различна химическа природа, състав и свойства, а именно полиетери като поли(етоксиетил глицидил етер) и полиестери като поли(ϵ -капролактон). Получените NAPC са амфифилни и образуват стабилни агрегати във воден разтвор. Агрегатите бяха изследвани задълбочено чрез различни техники - статично, динамично и електрофоретично разсейване на светлината, трансмисионна електронна микроскопия и атомна силова микроскопия. Размерът и моларните маси на частиците, както и други параметри като агрегационно число и брой олигонуклеотидни нишки на частица са значително по-големи от тези, съобщени за сферични нуклеинови киселини несъдържащи метали. Образоването на суперагрегати от по-малки отделни мицели или немицеларни комплекси се дължи на хидрофобните взаимодействия между синтетичните полимерни вериги и „лепливите“ взаимодействия между олигонуклеотиди като сдвояване на базови двойки, π -подреждане, водородно свързване. „Лепливите“ взаимодействия се уравновесяват чрез отблъскване между отрицателно заредените олигонуклеотидни нишки, като по този начин се осигурява колоидна стабилност на структурите. Повърхностната плътност на олигонуклеотидните нишки в наночастицата предполага, че последните са в конформация на произволна „намотка“ (гъба), а не в напълно разтегнат режим на „четка“. Отличителните свойства на прототипичните сферични нуклеинови киселини - нетоксичност и биосъвместимост, повишено клетъчно усвояване без нужда от трансфекционни агенти, подобрена нуклеазна стабилност - също са показани при новите наночастици, въпреки разликите в размера, морфологията и структурата.

14. Pavel Videv, Nikola Mladenov, Tonya Andreeva, Kirilka Mladenova, Veselina Moskova-Doumanova, Georgi Nikolaev, Svetla D. Petrova, **Jordan A. Doumanov**, Condensing Effect of Cholesterol on hBest1/POPC and hBest1/SM Langmuir Monolayers; 2021, *Membranes*, Volume 11, Issue 1, 52, **IF 3.094, Q2, SJR 0.54**

Summary

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 бестрофин-1 протеин (hBest1) е трансмембранен канал, свързан с калциево зависимия транспорт на хлорни йони в ретиналния пигментен епител, както и с транспорта на глутамат и GABA в нервните клетки. Взаимодействията между hBest1, сфингомиелини (SM), фосфатидилхолини и холестерол са от решаващо значение за свързването на hBest1 с домените на клетъчните мембрани и неговите биологични функции. Тъй като холестеролът играе „ключова“ роля при формирането на липидни рафтове, подреждането на липидите и моделирането/ремоделирането на латералната мембранна структура, ние изследвахме ефекта от различните концентрации на холестерол върху повърхностното напрежение на hBest1/ПОРС (1-палмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфохолин) и hBest1/SM Лангмюирови монослое в присъствието/отсъствието на Ca^{2+} йони с чрез измервания на повърхностното налягане и Брюстер ъгловата микроскопия. Тук ние съобщаваме, че холестеролът: (1) има пренебрежим кондензиращ ефект върху „чисти“ hBest1 монослое, открит главно в присъствието на Ca^{2+} йони, и; (2) предизвиква кондензиращ ефект върху съставни hBest1/ПОРС и hBest1/SM монослое. Тези резултати показват значението на междумолекулните протеин-липидни взаимодействия за конформационната динамика на hBest1 и неговите биологични функции като мултимерен йонен канал.

15. Pavel Videv, Kirilka Mladenova, Svetla Petrova, Jordan Doumanov, STRUCTURE AND FUNCTION OF hBEST1, EXPRESSED IN MDCK II CELLS, , Sofia University, “St. Kliment Ohridski”, Faculty of Biology, Department of Biochemistry, Bulgaria, 1164 Sofia, 8 Dragan Tzankov Blvd., p. 387-395, PKP-Print, <https://drive.google.com/file/d/1E-wzQ-k1L163yRieYFg8TIIj1mw0Hj5p/view?usp=sharing>, ISSN 1314-3425, Глава от Книга, регистрирана в НАЦИД, Виж приложения файл.

Summary

Bestrophinopathies are ocular diseases caused by mutations in the human bestrophin-1 (hBest1) - a transmembrane protein and Ca^{2+} -activated chloride channel, mainly expressed in retinal pigment epithelium cells. Its important biological functions range from chloride ions transport to transport of neurotransmitters such as Glu and GABA in the nervous system, involvement in the pathology of brain (Alzheimer's, Parkinson's diseases), regulation of cell volume, regulation of calcium levels and kinetics of volt-dependent channels. Our recent investigations on hBest1 structure-function relationship are concentrated on its interactions with phospholipid monolayers and model membrane systems in order to study Best disease pathogenesis and improve the quality of life in affected individuals.

Резюме

Бестрофинопатиите са очни заболявания, причинени от мутации в човешкия бестрофин-1 (hBest1) - трансмембранен протеин и Ca^{2+} - зависим хлорен канал, главно експресиран в клетките на ретиналния пигментен епител. Неговите важни биологични функции варират от транспорт на хлорни йони до транспорт на невротрансмитери като Glu и GABA в нервната система, участие в мозъчната патология (болестта на Алцхаймер, Паркинсон), регулиране на клетъчния обем, регулиране на нивата на

калций и кинетика на volt-dependen канали. Неотдавнашните ни изследвания върху връзката структура-функция hBest1 са съсредоточени върху нейните взаимодействия с фосфолипидни монослоеви и модели на мембранни системи, за да се изследва най-добре патогенезата на заболяването и да се подобри качеството на живот на засегнатите индивиди.

16. R. Veleva, V. Moskova-Doumanova, J. Doumanov, V. Kapchina-Toteva, T. Topouzova-Hristova, Comparative analysis of biological activity of extracts from cultivated and wild plants *Lamium album* L., Science and technology, 2014, Volume IV, Number 1, 122-126.

Summary

Lamium album L. (white dead nettle) is a plant widely used both in traditional and in folk medicine. In the scientific literature there is evidence of its broad-spectrum activity as astringent and anti-inflammatory agent, as well as a bacteriostatic and antispasmodic. This remarkable therapeutic effect was due to the wide variety of biologically active secondary metabolites of the plant. Mass collection of plants for commercial and medical purposes would jeopardize its natural populations. This requires comparison of the biological activity of extracts of plants cultured *in vitro* with those collected from natural deposits. In our previous studies we have demonstrated the potential antitumor activity of extracts of *Lamium album* L. On cell cultures. In this study, our attention was focused on the effect of extract from plants grown under different conditions on the cellular genome, the mitochondrial activity or the adhesion of normal and carcinoma cells. Our results indicate that, despite the poorer secondary metabolite composition, *in vitro* cultivated plants showed better antitumor activity.

Резюме

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

В предишните си проучвания демонстрирахме потенциалната антитуморна активност на екстракти от *Lamium album* L. в клетъчни култури. В това проучване нашето внимание беше съсредоточено върху ефекта на екстракт от растения, отглеждани при различни условия, върху клетъчния геном, митохондриалната активност и адхезията на нормални и карциномни клетки. Нашите резултати показват, че въпреки по-бедния състав на вторични метаболити, култивираните растения *in vitro* показват по-добро антитуморно действие.

17. T. Topouzova-Hristova, K. Mladenova, V. Moskova-Doumanova, R. Kalinova, E. Haladjova, I. Dimitrov, S. Rangelov, J. Doumanov, METHOD FOR DETECTION OF POLYCATIONIC NANOPARTICLES LOADED WITH DNA IN EUKARYOTIC CELLS , Science & Technologies, Volume V, Number 1, 2015, p 87-91.

Summary

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

Резюме

Разработването на нови системи (наночастици) за доставка на биологични макромолекули в еукариотните клетки е научен въпрос, интензивно изучаван през последните десетилетия. Повечето от използваните методи определят общата цитотоксичност или наличност на продукта в резултат на трансфекция, без да се отчита присъствието и поведението на самите наночастици в клетките. Това изисква разработването на методи, доказващи ефективно проникване и движение на наночастици в клетките. Ние предлагаме модифициран метод, чрез който може да се проследи проникването на наночастици, заредени с ДНК в различни клетъчни култури.

18. Ralitsa K. Veleva, Veselina S. Moskova-Doumanova, Milka N. Todorova, Antoaneta B. Trendafilova, Jordan A. Doumanov, Tanya I. Topouzova-Hristova, Cytotoxicity of flavonoid glycosides, flavonoid aglycones and phenolic acids from *Inula oculus-christi* L. on mammalian cell lines, J. BioSci. Biotechnol. 2016, 5(3): 219-224.

Summary

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

We have directed our efforts on investigating the effects of different extracts from *Inula oculus-christi* L., enriched with certain groups of biologically active substances - flavonoid glycosides (A), phenolic acids (B), flavonoid glycosides and phenolic acids (C), flavonoid aglycones and phenolic acids (D). The effect of these extracts on normal (MDCK II and RPE1) and carcinoma cell lines (A549 and HepG2) was evaluated. We have performed cytotoxicity study (crystal violet assay) as well as morphological analysis

of changes induced by the extracts. Among the tumor cell lines HepG2 show greater sensitivity. Surprisingly extract C has no significant influence on both cancer cell lines.

Резюме

Билките от рода *Inula* са добре познати в традиционната медицина. Техните екстракти се използват като отхрачващи и бактерицидни средства, както и за лечение на възпаление на белите дробове, защото притежават противовъзпалителна и секретолитична активност. Резултатите от експериментални изследвания показват антитуморния ефект на някои компоненти на екстракти от *Inula cappa* и *Inula britannica*, а тези от *Inula racemosa* имат антимикробна и антидиабетна активност. Ние насочихме вниманието си към изследване на ефектите на различни екстракти от *Inula oculus-christi* L., обогатени с определени групи биологично активни вещества - флавоноидни гликозиди (А), фенолни киселини (В), флавоноидни гликозиди и фенолни киселини (С), флавоноидни агликони и фенолни киселини (D). Определихме ефекта на тези екстракти върху нормални (MDCK II и RPE1) и карциномни клетъчни линии (A549 и HepG2). Извършихме изследване на цитотоксичността (чрез кристално виолетово оцветяване), както и морфологичен анализ на промените, индуцирани от екстрактите. Сред туморните клетъчни линии HepG2 показват по-голяма чувствителност към екстрактите. Показахме, че екстрактът С няма значително влияние и върху двете ракови клетъчни линии.

19. RALITSA VELEVA, VESELINA MOSKOVA-DOUMANOVA , DANIELA DRAGOLOVA, JORDAN DOUMANOV, TANYA TOPOUZOVA-HRISTOVA, COMPARATIVE ANALYSIS OF CYTOTOXICITY OF CHLOROFORM EXTRACTS FROM LAMIUM ALBUM L. AND MORPHOLOGICAL ALTERATIONS IN MAMMALIAN CELLS, Annuaire de l'Université de Sofia "St. Kliment Ohridski", Faculte de Biologie, 2017, volume 102, livre 4, pp. 194-204, Youth Scientific Conference "Kliment's Days", Sofia 2016.

Summary

Lamium album L. is a plant commonly used in traditional medicine because of its anti-inflammatory, astringent, antiseptic and antispasmodic activities. There are differences in the composition of secondary metabolites in plants grown in their natural habitats (*in vivo*), micropropagated plants (*in vitro*) and after their subsequent cultivation in a natural environment (*ex vitro*). In this study we aim to compare the activity of chloroform Soxhlet extracts from *Lamium album* plants, collected from a wild population, cultivated *in vitro* and adapted *ex vitro* on A549 human cancer cell line and the non-cancer kidney epithelial cells MDCKII. We have performed cell cytotoxicity test (crystal violet assay) and membrane permeability test (trypan blue exclusion assay) as well as morphological analysis of changes induced by the extracts.

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

Резюме

Lamium album L. е растение, което се използва често в традиционната медицина поради своите противовъзпалителни, стягащи, антисептични и спазмолитични действия. Има разлики в състава на вторичните метаболити в растения, отглеждани в естествените им местообитания (*in vivo*), микроразмножаващи се растения (*in vitro*) и след последващото им култивиране в естествена среда (*ex vitro*). В това проучване имаме за цел да сравним активността на хлороформните екстракти Soxhlet от растения *Lamium album*, събрани от дива популация, култивирани *in vitro* и адаптирани *ex vitro* върху A549 клетъчна линия от човешки тумор и неракови бъбречни епителни клетки MDCKII. Проведохме тест за клетъчна цитотоксичност (анализ чрез кристално виолетово оцветяване) и тест за пропускливост на мембраната (анализ с трипаново синьо), както и морфологичен анализ на промените, индуцирани от екстрактите.

При третиране с екстракти *ex vitro* се наблюдава голям процент клетки с увредени мембрани за 24 часа. След 48 часа общият брой на клетките намалява, но клетките с увредени мембрани са относително малко. За сравнение, 48 часа след третиране с *in vitro* екстракти, бяха наблюдавани 100% увредени клетки от линията A549.

- 20. COMPARATIVE ANALYSIS OF EFFECTS OF SESQUITERPENE LACTONES AND POLYPHENOLS FROM INULA OCULUS-CHRISTI L. ON NORMAL AND CANCER CELLS, R. VELEVA, M. BORISOVA, M. MILEV, A. KOSTADINOVA, B. MRAVKOV, J. DOUMANOV, V. MOSKOVA-DOUMANOVA, A. TRENDAFILOVA, M. TODOROVA, T. TOPOUZOVA-HRISTOVA, Annuaire de l'Université de Sofia "St. Kliment Ohridski", Faculte de Biologie, 2018, volume 103, livre 4, pp. 13-21, Youth Scientific Conference "Kliment's Days", Sofia 2017.**

Summary

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

Резюме

Растителните екстракти са широко използвани в традиционната медицина от векове. Експерименталните изследвания върху някои билки от род *Inula* показват антитуморен ефект на някои от компонентите на растителните екстракти. Нашите предишни проучвания разкриха по-силен антипролиферативен ефект на общите екстракти от *Inula oculus-christi* върху раковите клетки в сравнение с нераковите клетки. Нашите сегашни изследвания са свързани с идентифициране на компонентите на екстрактите, отговорни за наблюдаваните ефекти. Целта на това проучване беше да се установят ефектите на два екстракта върху раковите и нераковите клетки. Единият от тях е обогатен със сесквитерпенови лактони (екстракт А), а вторият - с фенолни киселини и флавоноиди (полифеноли, екстракт В). Като моделна система използвахме неракова MDCKII клетъчна линия и ракова клетъчна линия A549. Цитотоксичността беше измервана спектрофотометрично чрез кристално виолетов анализ и беше определен IC50 за двата екстракта от двете клетъчни линии. Промените в морфологията на клетките беше наблюдавана микроскопски. Определеният IC50 е по-висок при нераковите клетки, отколкото за раковите клетки. След третиране с екстрактите, наблюдавахме и леки/средни промени в морфологията на MDCK II клетките. Нашите резултати показват по-силно въздействие на изследваните екстракти върху раковите клетки, а не върху нераковите клетки. Екстрактите, обогатени със сесквитерпенови лактони, показват по-силен цитотоксичен ефект.

Юни, 2021

Автор:

доц. д-р Йордан Атанасов Думанов

June, 2021

Author:

Assoc. Prof. Dr. Jordan Atanassov Doumanov