

РЕЗЮМЕТА НА РЕЦЕНЗИРАНИТЕ НАУЧНИ ТРУДОВЕ И ПУБЛИКАЦИИ

на английски и български език

на гл. ас. д-р Людмила Филипова Беленска-Тодорова,

представени за участие в конкурс за заемане на академичната длъжност „Доцент“ в област на висше образование 4.Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки (Биология на човека), обявен в ДВ, бр. 48 от 28.06.2022 г.

I. Показател В 4. Хабилитационен труд – монография

Системата на комплемента при възпалителните ставни заболявания, Людмила Беленска-Тодорова, Университетско издателство "Св. Климент Охридски", София, 2019, ISBN:978-954-07-4652-4

През последните години нарасна значението на възпалителните ставни заболявания поради повишаването на средната възраст на населението и свързаните с него икономически и социални разходи. Все повече се увеличават честотата и тежестта на всички видове болести на ставите и костите, а те са съпроводени с различни по етиология и интензивност възпалителни процеси и загуба на костна и хрущялна тъкан. Прогресията им е свързана с постоянно усещане на болка и дискомфорт, водещи до постепенна загуба на нормална двигателна активност и работоспособност, до социална изолация и сериозно влошаване качеството на живот, а в много случаи до инвалидизиране. Някои от тези заболявания имат системни прояви, които са причина за допълнителни усложнения, застрашаващи живота на пациента, като сърдечно-съдови, белодробни, офталмологични и други заболявания. Все още не са напълно изяснени точните механизми за развитието на различните видове артрит, тъй като те са комплексни и включват генетично предразположение, фактори на средата и нарушения в имунната регулация.

Разработени са различни експериментални модели на артрит с цел да бъдат по-добре изучени заболяванията на ставите и да бъде постигнато тяхното по-ефективно лечение. Дегенеративните промени при възпалителните ставни заболявания се дължат на дисбаланс на различни фактори, действащи в сложна мрежа едновременно като компоненти на имунната система и регулатори на костната хомеостаза. В синовиума на пациенти с различни видове артрит е доказано наличието на активирани компоненти от системата на комплемента, както и повишена експресия на рецепторите за тях. В литературата има голямо количество данни за експерименти доказващи значението на активността на комплемента за патогенезата на тези заболявания и разрушаването на тъканите. Взаимодействието на компонентите на комплемента с техните рецептори

експресирани от различни типове клетки участващи в артритните заболявания е част от сложния механизъм, който регулира ремоделирането на ставните тъкани. При някои заболявания, като например ревматоидния артрит, вече се прилагат препарати, чието действие е насочено към блокиране действието на комплемента и ефектът от тях е обещаващ.

През последното десетилетие нашият екип също има принос в изясняването на ролята на комплемента във възпалителните ставни заболявания. Изследванията, които се провеждат са насочени към изучаване ролята на комплемента в животински модели на ревматоиден артрит и на остеоартроза. По-често използваният от нас миши модел на ревматоиден артрит е зимозан-индуцираният артрит (ЗИА), предизвикван чрез вътреставно инжектиране в кухината на глезенната става със zymosan A, получен от дрождите *Saccharomyces cerevisiae* (Z4250, Sigma-Aldrich, Munich, Germany). Освен ЗИА, за изследване конкретно на ролята на алтернативния път на комплемента, използвахме и миши модел на колаген-антитяло индуциран артрит (КАИА). Той бива предизвикван чрез интраперитонеално инжектиране на мишки с коктейл от 4 моноклонални антитела срещу колаген тип II (ArthritoMab™, MD Biosciences, USA). Известно е, че ArthritoMab™ се свързва с епитопите C1^I, J1, U1 и D3 на CII фрагментите (CB8, CB10 и CB11). При КАИА на третия ден всички мишки биват инжектирани интраперитонеално с LPS (*Escherichia coli* 055:B5, MD Biosciences, USA; 50 µg/200 µl endotoxin-free water). Използваният от нас модел на остеоартроза е миши модел на колагеназа индуциран остеоартрит (КИОА). За целта остеоартритът беше предизвикан чрез двукратно вътреставно (i.a.) инжектиране на колагеназа. И за трите модела за контрола се използват мишки, които са инжектирани еквивалентно количество PBS (pH 7.4), съответно в ставата за ЗИА и КИОА и интраперитонеално за КАИА. Екипът ни провежда също *in vitro* изследвания на клетъчни култури, получени от моделите на артрит, с оглед на това да бъде проследявано въздействието на определени фактори върху клетъчната диференциация. В настоящата монография са включени провежданите от екипа ни изследвания върху ролята на комплемента при възпалителни ставни заболявания, както и пълно изложение и обобщение на съществуващите данни в литературата от експерименти, провеждани от водещи изследователски екипи по цял свят. Освен най-популярните възпалителни ставни заболявания ревматоиден артрит и остеоартроза, в монографията обстойно са разгледани съществуващите данни за ролята на комплемента при ювенилния идиопатичен артрит, анкилозиращия спондилит, септичния и псориазичния артрит. Освен това, е обобщено и описано съществуващото знание за компонентите на системата на комплемента, рецепторите за тях, пътищата на активиране и механизмите на регулация. Обобщени са и терапевтичните подходи, които се прилагат за лечението на възпалителните ставни заболявания чрез повлияване активността на комплемента.

В монографията е отделено място и на две съвременни направления в остеоимунологията. Едното от тях е насочено към ролята на мегакариоцитите и

тромбоцитите във възпалителните ставни заболявания и влиянието на комплемента върху числеността и разпространението им в организма. Доскоро на тези клетки не беше обръщано достатъчно внимание при изучаването на сложните механизми на патогенеза на артритните заболявания. Все повече данни показват, че мегакариоцитите и тромбоцитите участват в междуклетъчните взаимодействия, стоящи в основата на деструктивните процеси в ставата, както и в някои от системните прояви на артрит, като тромбоцитозата. Екипът ни също има принос, показвайки, че числеността и локализацията на мегакариоцитите при артритните заболявания се влияе от активността на комплемента. Друго направление в остеоимунологията е насочено към изследване ролята на затлъстяването и по-конкретно на бялата мастна тъкан, в механизмите на патогенеза на възпалителните заболявания на ставите. В модерните представи бялата мастна тъкан е много повече от място за натрупване на молекули с висока енергийна стойност. Прието е, че тя отговаря на характеристиките на орган с ендокринна функция. Клетките му, известни като адипоцити, произвеждат голямо разнообразие от биологично активни молекули, повечето от които участват във възпалението. Едни от тези молекули са ключови компоненти от системата на комплемента. В монографията са обобщени данните в литературата, показващи значението на отделяните от адипоцитите молекули за развитието на артрит.

Описаните в монографията данни могат да послужат за разработване на нови терапевтични подходи, чрез които да бъде контролирано действието на комплемента и така да се постигне по-ефективна превенция и лечение на възпалителните ставни заболявания. Монографията би могла да послужи за целите на обучение на студенти, специализанти и докторанти, а също и за работата на широк кръг от специалисти в експерименталната и в клиничната област.

In recent years, inflammatory joint diseases have become of special interest due to the increase in the average age of the population and the associated economic and social costs. The frequency and severity of all types of diseases of the joints and bones are increasing, and they are accompanied by different etiologies and intensity of inflammatory processes and loss of bone and cartilage tissue. Their progression is associated with constant feelings of pain and discomfort, leading to a gradual loss of normal motor activity and performance, to social isolation and severe deterioration in quality of life, and in many cases to disability. Some of these diseases have systemic manifestations that cause additional life-threatening complications for the patient, such as cardiovascular, pulmonary, ophthalmic and other diseases. The exact mechanisms for the development of different types of arthritis are not yet fully understood, as they are complex and include genetic predisposition, environmental factors and disorders of immune regulation.

Various experimental models of arthritis have been developed in order to better study joint diseases and achieve more effective treatment. Degenerative changes in inflammatory joint diseases are due to an imbalance of various factors acting in a complex network both as

components of the immune system and regulators of bone homeostasis. In the synovium of patients with various types of arthritis, the presence of activated components of the complement system has been proven, as well as increased expression of receptors for them. There is a large amount of experimental data in the literature proving the importance of complement activity for the pathogenesis of these diseases and tissue destruction. The interaction of complement components with their receptors expressed by different cell types involved in arthritis is part of the complex mechanism that regulates joint tissue remodeling. In some diseases, such as rheumatoid arthritis, drugs are already used which action is aimed at blocking the complement and their effect is promising.

Over the last decade, our team has also contributed to elucidating the role of complement in inflammatory joint disease. The research that is being conducted is aimed at studying the role of complement in animal models of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. The most common mouse model of rheumatoid arthritis we use is zymosan-induced arthritis (ZIA), caused by intra-articular injection into the ankle cavity with zymosan A, obtained from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Z4250, Sigma-Aldrich, Munich, Germany). In addition to the ZIA, we also used a mouse model of collagen-antibody-induced arthritis (CAIA) to specifically study the role of the alternative complement pathway. It was induced by intraperitoneal injection of mice with a cocktail of 4 monoclonal antibodies against type II collagen (ArthritoMab™, MD Biosciences, USA). ArthritoMab™ is known to bind to the C1I, J1, U1 and D3 epitopes of the CII fragments (CB8, CB10 and CB11). In CIA on day 3, all mice were injected intraperitoneally with LPS (*Escherichia coli* 055: B5, MD Biosciences, USA; 50 µg / 200 µl endotoxin-free water). The osteoarthritis model we use is a mouse model of collagenase-induced osteoarthritis (CIOA). For this purpose, osteoarthritis was induced by double intra-articular (i.a.) injection of collagenase. For all three control models, mice were injected with an equivalent amount of PBS (pH 7.4), respectively, in the joint for ZIA and CIOA and intraperitoneally for CAIA. Our team also conducts in vitro studies of cell cultures derived from arthritis models in order to monitor the impact of certain factors on cell differentiation. This monograph includes research conducted by our team on the role of complement in inflammatory joint disease, as well as a full presentation and summary of existing data in the literature from experiments conducted by leading research teams around the world. In addition to the most popular inflammatory joint diseases, rheumatoid arthritis and osteoarthritis, the monograph examines the existing data on the role of complement in juvenile idiopathic arthritis, ankylosing spondylitis, septic and psoriatic arthritis. In addition, existing knowledge of the components of the complement system, their receptors, activation pathways, and regulatory mechanisms is summarized and described. Therapeutic approaches that are used for the treatment of inflammatory joint diseases by influencing the activity of complement are also summarized.

The monograph also focuses on two modern trends in osteoimmunology. One of them focuses on the role of megakaryocytes and platelets in inflammatory joint diseases and the influence of complement on their number and distribution in the body. Until recently, these cells were not given enough attention in studying the complex mechanisms of the pathogenesis of arthritis.

Increasing evidence suggests that megakaryocytes and platelets are involved in the intercellular interactions underlying destructive processes in the joint, as well as in some of the systemic manifestations of arthritis, such as thrombocytosis. Our team also contributed by showing that the number and location of megakaryocytes in arthritis is influenced by complement activity. Another direction in osteoimmunology is aimed at studying the role of obesity, and in particular white adipose tissue, in the mechanisms of pathogenesis of inflammatory diseases of the joints. In modern notions, white adipose tissue is much more than a place for the accumulation of high-energy molecules. It is considered to correspond to the characteristics of an organ with endocrine function. Its cells, known as adipocytes, produce a wide variety of biologically active molecules, most of which are involved in inflammation. Some of these molecules are key components of the complement system. The monograph summarizes the data in the literature showing the importance of molecules released by adipocytes for the development of arthritis. The data described in the monograph can be used to develop new therapeutic approaches to control the action of complement and thus achieve more effective prevention and treatment of inflammatory joint diseases. The monograph could be used for the training of students, and postgraduates, as well as for the work of a wide range of specialists in the experimental and clinical fields.

II. ПУБЛИКАЦИИ ГРУПА Г.5: Публикувана монография, която не е представена като основен хабилитационен труд

Сепсис, Людмила Беленска-Тодорова, Университетско издателство "Св. Климент Охридски", София, 2021, ISBN:9789540751634

Сепсисът е една от основните причини за смърт при пациентите с инфекциозни заболявания в критично състояние. Това се дължи на увеличаващата се антибиотична резистентност, нарастващия дял на застаряващото население, честото прилагане на имunosупресивни терапии, по-достъпните медицински технологии и интервенции. Пациентите, които оцеляват след развиване на сепсис, остават с трайни увреждания заради функционални дефицити и намалено качество на живот, а рискът от смърт впоследствие при тях се увеличава. Съвременните антибиотици и терапевтични подходи, използвани при интензивното му лечение, се оказват все още незадоволително ефективни. Самото състояние сепсис има различна степен на изява в хода на развитието си при отделните пациенти. То е описвано с група свързани с него термини, критериите за които търпят постоянно изменение, успоредно с напредването на съвременните познания. Такива термини, отразяващи различната сила на изява на септичните състояния в хода на развитието им са: синдром на системен възпалителен отговор (systemic inflammatory response syndrome, SIRS), сепсис, тежък сепсис, септичен шок, синдром на множествена органа дисфункция.

Критериите за определяне на септичните състояния биват периодично преразглеждани и определяни в научната общност, следвайки разширяването на познанията за механизмите на развитие на сепсиса. Установени са прагови стойности на ключови за заболяването биомаркери, съответстващи на настъпващите увреждания на органите, причинени от нарушената регулация на отговора на организма към съществуваща инфекция. В предклиничните изследвания се използват животински модели, които наподобяват по-късните етапи на сепсис и полиорганна недостатъчност и позволяват изпитването на различни терапевтични подходи и измерването на техните ефекти върху състоянието на организма. Съществуват няколко хипотези за развитието на сепсиса, базиращи се на наблюдения върху физиологичните промени, както при пациенти, така и при модели, използващи експериментални животни. В монографията са описани основните фактори, влияещи върху развитието на фазите на сепсис при човека, включващи ролята на възпалението, цитокините и комплемента, както и участието на конкретни популации от клетки, взаимодействащи си с определени костимулиращи молекули. Особено внимание е обърнато на нарушенията във функциите на имунните клетки като аномалии на толерантността и програмираната им смърт. Описани са основни вътреклетъчни механизми, осъществяващи се с участието на ендоплазматичния ретикулум.

Нашият екип също има принос в изясняването на механизмите на развитието на сепсиса и разработването на терапевтични стратегии за лечението му. Едни от изследванията целяха изучаване ролята на апоптозата в модел на сепсис, индуциран в мишки чрез интраперитонеално инжектиране на зимозан А (компонент от клетъчната стена на дрождите *Saccharomyces cerevisiae*), което води до генерализирано възпаление, наподобяващо септичния шок при човека. Екипът ни проведе също *in vitro* изследвания на клетъчни култури, получени от модела на сепсис, с оглед на това да бъде проследявано въздействието на определени фактори върху клетъчната диференциация и апоптозата. Установихме, че използването на анти-TRAIL антитела в началото на експерименталния сепсис, води до облекчаване на симптомите му, чрез ограничаване на настъпващата апоптоза на имунни клетки.

В други наши експерименти със същия модел на зимозан-индуциран сепсис, изследвахме ролята на системата на комплемента, като за целта изчерпахме серумната му активност непосредствено преди индуцирането на сепсис чрез интраперитонеално инжектиране на кобра веном фактор (cobra venom factor, CVF), структурно идентичен с C3b фрагмента на комплемента. Установихме, че отсъствието на серумна активност на комплемента намалява броя на провъзпалителните имунни клетки и потиска зимозан-индуцираната органна недостатъчност, тъй като ограничава увреждането на черния дроб и променя нивата на чернодробните ензими. Получените от нас резултати показват, че нхибирането на функционалната активност на комплемента би намерило приложение в терапевтични подходи, с които да бъде ограничено развитието на органна недостатъчност при сепсиса.

Описаните в монографията данни могат да послужат за разработване на нови терапевтични подходи за постигне на по-ефективна превенция и лечение на сепсиса и септичния шок. Монографията би могла да послужи за целите на обучението на студенти, специализанти и докторанти, а също и за работата на широк кръг от специалисти в експерименталната и в клиничната област.

Sepsis is one of the leading causes of death in patients with critical infectious diseases. This is due to increasing antibiotic resistance, the growing proportion of the aging population, the frequent use of immunosuppressive therapies, more affordable medical technologies and interventions. Patients who survive sepsis remain permanently impaired due to functional deficits and reduced quality of life, and their risk of death subsequently increases. Modern antibiotics and therapeutic approaches used in intensive care are still unsatisfactory. The condition sepsis itself has a different degree of manifestation in the course of its development in individual patients. It is described by a group of related terms, the criteria for which are constantly changing, along with the advancement of modern knowledge. Such terms, reflecting the different strength of the manifestation of septic conditions in the course of their development are: systemic inflammatory response syndrome (SIRS), sepsis, severe sepsis, septic shock, multiple organ dysfunction syndrome.

The criteria for determining septic conditions are periodically reviewed and determined in the scientific community, following the expansion of knowledge about the mechanisms of development of sepsis. Threshold values of key biomarkers corresponding to the ongoing organ damage caused by impaired regulation of the body's response to existing infection have been established. Preclinical studies have used animal models that mimic the later stages of sepsis and multiorgan failure and allow the testing of different therapeutic approaches and the measurement of their effects on the body. There are several hypotheses about the development of sepsis based on observations of physiological changes in both patients and models using experimental animals. The monograph describes the main factors influencing the development of phases of sepsis in humans, including the role of inflammation, cytokines and complement, as well as the participation of specific populations of cells interacting with certain costimulatory molecules. Particular attention is paid to disorders in the function of immune cells such as abnormalities of tolerance and their programmed death. The main intracellular mechanisms involved in the endoplasmic reticulum are described.

Our team also contributes to elucidating the mechanisms of sepsis development and developing therapeutic strategies for its treatment. One of the studies is directed towards the role of apoptosis in a model of sepsis induced in mice by intraperitoneal injection of zymosan A (a component of the yeast cell wall *Saccharomyces cerevisiae*), which leads to generalized inflammation resembling septic shock in humans. Our team also conducted *in vitro* studies of cell cultures derived from the sepsis model, in order to monitor the impact of certain factors on cell differentiation and apoptosis. We found that the use of anti-TRAIL antibodies at the beginning of experimental sepsis alleviates its symptoms by limiting the onset of apoptosis of immune cells.

In other experiments with the same model of zymosan-induced sepsis, we investigated the role of the complement system by depleting its serum activity immediately before inducing sepsis by intraperitoneal injection of cobra venom factor (CVF), structurally identical to C3b fragment of complement. We found that the absence of serum complement activity reduced the number of pro-inflammatory immune cells and suppressed zymosan-induced organ dysfunction as it limited liver damage and altered liver enzyme levels. The results obtained by us show that inhibition of the functional activity of complement would find application in therapeutic approaches to limit the development of organ failure in sepsis.

The data described in the monograph can be used to develop new therapeutic approaches to achieve more effective prevention and treatment of sepsis and septic shock. The monograph could be used for the purposes of training students, postgraduates and doctors, as well as for the work of a wide range of specialists in the experimental and clinical fields.

III. ПУБЛИКАЦИИ ГРУПА Г.6: Публикувана книга на базата на защитен дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен "доктор" или за присъждане на научна степен "доктор на науките"

Людмила Беленска-Тодорова, Роля на комплемента в процесите на ставна деструкция при експериментални модели на ревматоиден артрит, Университетско издателство "Св. Климент Охридски", София, ISBN:978-954-07-4651-7

Ревматоидният артрит (РА) е хронично ставно възпалително заболяване, характеризиращо се със силен синовит и разрушаване на костта и хрущяла. Прогресията му е свързана с постоянно усещане на болка и дискомфорт, водещи до постепенна загуба на нормална двигателна активност и работоспособност, до социална изолация и сериозно влошаване качеството на живот, а в много случаи до инвалидизиране. Системните прояви на РА са причина за допълнителни усложнения, застрашаващи живота на пациента, като сърдечно-съдови, белодробни, офталмологични и други заболявания. Все още не са напълно изяснени точните механизми за развитието на РА, тъй като те са комплексни и включват генетично предразположение, фактори на средата и нарушения в имунната регулация. В последните години са разработени различни експериментални модели на артрит с цел да бъдат по-добре изучени заболяванията на ставите и да бъде постигнато тяхното по-ефективно лечение.

Дегенеративните промени при РА се дължат на дисбаланс на различни фактори, действащи в сложна мрежа едновременно като компоненти на имунната система и регулатори на костната хомеостаза. В синовиума на пациенти с РА е доказано наличието на активирани компоненти от системата на комплемента. Вероятно те играят важна роля в патогенезата на това заболяване и разрушаването на тъканите. Активността на комплемента е свързана с промени в нивата на цитокините, а те участват в поддържането и хронифицирането на възпалителните процеси. Прилагането на нови терапевтични

подходи, чрез които да бъде контролирано действието на комплемента, са необходими за по-ефективна превенция и лечение на ревматоидния артрит.

В настоящото издание са обобщени резултатите от дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен "Доктор" с направление "Биологически науки" 4.3., научна специалност "Имунология" 01.06.23. Основната насока е към изясняване влиянието на комплемента върху различни клетъчни популации и медиатори на деструкцията на костта при два модела на ревматоиден артрит - зимозан-индуциран артрит и колаген-антитяло-индуциран артрит. Описаният дисертационен труд е осъществен под ръководството на професор Нина Ивановска, дбн.

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory joint disease characterized by severe synovitis and destruction of bone and cartilage. Its progression is associated with constant feelings of pain and discomfort, leading to a gradual loss of normal motor activity and performance, to social isolation and severe deterioration in quality of life, and in many cases to disability. Systemic manifestations of RA are the cause of additional life-threatening complications of the patient, such as cardiovascular, pulmonary, ophthalmic and other diseases. The exact mechanisms for the development of RA are not yet fully understood, as they are complex and include genetic predisposition, environmental factors and disorders of immune regulation. In recent years, various experimental models of arthritis have been developed in order to better study joint diseases and achieve more effective treatment.

Degenerative changes in RA are due to an imbalance of various factors acting in a complex network simultaneously as components of the immune system and regulators of bone homeostasis. The presence of activated components of the complement system has been demonstrated in the synovium of RA patients. They probably play an important role in the pathogenesis of this disease and tissue destruction. Complement activity is associated with changes in cytokine levels, and they are involved in the maintenance and chronicity of inflammatory processes. The application of new therapeutic approaches to control the action of complement is necessary for more effective prevention and treatment of rheumatoid arthritis.

This edition summarizes the results of a dissertation for the award of educational and scientific degree "Doctor" with direction "Biological Sciences" 4.3., Scientific specialty "Immunology" 01.06.23. The main focus is to elucidate the effect of complement on different cell populations and mediators of bone destruction in two models of rheumatoid arthritis - zymosan-induced arthritis and collagen-antibody-induced arthritis. The described dissertation work was carried out under the supervision of Professor Nina Ivanovska, Ph.D.

IV. ПУБЛИКАЦИИ ГРУПА Г.7: Научни публикации в издания реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (Web of Science и Scopus) извън дисертационния труд за придобиване на ОНС „Доктор“

1. P. Ganova, **L. Belenska-Todorova**, N. Ivanovska Effect of estradiol on chondrocytes in the active stage of collagenase-induced osteoarthritis, *Current bioactive compounds* vol:18, issue 10, 2022, <https://doi.org/10.2174/1573407218666220118094935> Q3 (в Scopus, не е отразено в Web of Science), IF = 1.309, инд. IF = 0.44

Резюме:

Цел: Целта на настоящото изследване е да бъде проучен ефектът на естрадиола върху потенциала за възпаление и апоптоза при миши модел на остеоартрит (ОА).

Въведение: ОА е дегенеративно заболяване на ставите протичащо с нарушаване на структурата на ставния хрущял и съществени изменения в подхрущялната кост. Естрадиолът (ЕД) е считан за важен участник в поддържането на костната хомеостаза. Все повече доказателства се натрупват за това, че има връзка между тежестта на ерозията на хрущяла и смъртта на хондроцитите.

Особено важно е да бъде изяснена ролята на хондроцитите в развитието на ОА и каква е връзката с нивата на естроген в организма.

Материали и методи: Изследването беше проведено върху модел на колагеназа-индуциран остеоартрит (КИОА) при мишки ICR (CD-2).

Резултати: В клетъчните култури ЕД редуцира броя на TGF- β 1 положителните и на двойно-положителните CD200+/TNF- α + хондроцити. Стимулирането с ЕД *in vitro* понижи честотата на апоптозата и на продукцията на MMP-13 при артритните хондроцити и инхибира отделянето на възпалителните цитокини IL-6 и IL-8.

Заклучение: Резултатите ни показват, че ЕД се отразява на функциите на хондроцитите участвайки в противоартритен механизъм и поради това може да бъде перспективно средство за лечение на ОА.

Ключови думи: естрадиол, хондроцити, колагеназа-индуциран остеоартрит (КИОА), IL-6, IL-8, MMP-13

Review:

Aims: The aim of the present study is to examine the effect of estradiol on chondrocyte inflammatory potential and apoptosis in a mouse model of osteoarthritis (OA).

Background: OA is a degenerative joint disease related to articular cartilage disintegration, together with substantial changes in the subchondral bone. Estradiol (ED) is considered to be an important player in maintaining bone homeostasis. Increasing evidence support the association between the severity of cartilage erosion and chondrocyte death.

Objective: It is of great importance to elucidate the role of chondrocytes in the development of OA in relation to estrogen levels.

Methods: The present work was conducted on a model of collagenase-induced osteoarthritis (CIOA) in ICR (CD-2) mice. The cytokine and MMP-3 concentrations were assayed by ELISA, and apoptosis of chondrocytes was determined by flow cytometry.

Results: ED decreased the number of cultured TGF- β 1 positive chondrocytes, reduced the percentage of double-positive CD200+/TNF- α + chondrocytes. ED reduced the rate of apoptosis and MMP-13 production of stimulated arthritic chondrocytes, and inhibited the release of inflammatory IL-6 and IL-8 cytokines *in vitro*.

Conclusion: Our results show that ED affects chondrocyte functions as a part of its anti-arthritic mechanism of action and it might be a perspective drug for healing OA.

Keywords: Estradiol, Chondrocytes, Collagenase-Induced Osteoarthritis (CIOA), IL-6, IL-8, MMP-13

2. **L. Belenska-Todorova**, S. Nikolova Lambova, S. Stoyanova, E. Georgieva, T. Batsalova, D. Moten, D. Kolchakova, B. Dzhambazov, Disease-modifying potential of metformin and alendronate in an experimental mouse model of osteoarthritis, *Biomedicines*, vol:9, issue:8, 2021, pages:1-12, <https://doi.org/10.3390/biomedicines9081017> **Q1, IF = 6.081, инд. IF = 0.76**

Резюме:

Остеоартритът (ОА) е най-често срещаното дегенеративно ставно заболяване причиняващо прогресивно увреждане на хрущяла и подхрущялната кост, възпаление на синовиума и силна болка. Терапевтичните подходи към различните форми на ОА са стандартизирани, въпреки сложните патоморфологични промени, които се наблюдават при ОА. Като цяло обаче, резултатите от фармакологичното лечение са незадоволителни. Нашето изследване имаше за цел да бъде изследван ефектът на веществата метформин и алендронат, както и на тяхната комбинация, върху развитието и прогресията на ОА при мишки с колагеназа-индуциран остеоартрит (КИОА).

Женски ICR (CD-2) мишки бяха разпределени в 5 групи: контролна, нетретирана с КИОА, КИОА + метформин, КИОА + алендронат и КИОА + метформин + алендронат. ОА беше индуциран чрез вътреставно инжектиране с колагеназа. Фенотипът на ОА беше анализиран чрез флоуцитометрия (за диференциация на костномозъчни клетки), ELISA (за серумните нива на адипокините лептин и резистин и хистологично (за патологични изменения на коленната става).

Третирането с метформин, алендронат или тяхната комбинация доведе до инхибиране на експресията на RANK и RANKL върху остеобластите и остеокластите, получени при *ex vivo* култивиране на костномозъчни клетки в минерализираща или остеокластогенна среда. Третирането с метформин беше ефективно за намаляване на диференциацията на фибробластите, но не и на мезенхимните стволови клетки, докато алендронатът оказва

обратен ефект. Комбинацията от метформин и алендронат потисна диференциацията както на мезенхимните стволови клетки, така и на фибробластите. Третирането с метформин, алендронат и с тяхната комбинация понижи серумните концентрации на лептин и резистин в хроничната фаза на артрит. Хистопатологичното изследване показва, че в сравнение с нетретираната група с КИОА (9 точки за ОА), групата с метформин (4 точки за ОА) или алендронат (6 точки за ОА) имаха по-нисък брой точки по отношение на промените в хрущяла. Комбинацията от метформин и алендронат значително намали степента на дегенерация на хрущяла (2 точки за ОА), заради което тази комбинация би могла да намери приложение в терапевтичните подходи за пациенти с ОА.

Ключови думи: остеоартрит, миши модел, метформин, бисфосфонат, третиране, остеокластогенеза, адипокини, хистопатология

Review:

Osteoarthritis (OA) is the most common degenerative joint disease causing progressive damages of the cartilage and subchondral bone, synovial inflammation, and severe pain. Despite the complex pathomorphological changes that occur in OA, the approach to different forms of OA is standardized. The global results from pharmacological treatment are not satisfactory. Hence, this study aimed to explore the effects of metformin, alendronate, and their combination on OA development and progression in mice with collagenase-induced osteoarthritis (CIOA).

Female ICR (CD-2) mice were randomized to five groups: control group, CIOA untreated, CIOA + metformin, CIOA + alendronate, and CIOA + metformin + alendronate. OA was induced by the intra-articular (i.a.) injection of collagenase. OA phenotype was analyzed by flow cytometry (bone marrow cell differentiation), ELISA (serum levels of the adipokines leptin and resistin), and histology (pathological changes of the knee joint).

Treatment with metformin, alendronate, or their combination inhibited the expression of RANK and RANKL on osteoblasts and osteoclasts obtained by *ex vivo* cultivation of bone marrow cells in mineralization or osteoclastogenic media. In addition, metformin treatment was effective for the attenuation of fibroblast differentiation, but not of mesenchymal stem cells (MSCs), while alendronate had an opposite effect. The combination of metformin and alendronate had a suppressive effect on both MSCs and fibroblasts differentiation. Treatment with metformin, alendronate, and their combination decreased serum concentrations of leptin and resistin in the chronic phase of arthritis. The histopathological examination showed that compared with the untreated CIOA group (OA score 9), the groups treated with metformin (OA score 4) or alendronate (OA score 6) had lower scores for cartilage changes. Metformin combined with alendronate significantly decreased the degree of cartilage degeneration (OA score 2), suggesting that this combination might be a useful approach for the treatment of OA patients.

Keywords: osteoarthritis; mouse model; metformin; bisphosphonate; treatment; osteoclastogenesis; adipokines; histopathology

3. S. Nikolova Lambova, T. Batsalova, D. Moten, S. Stoyanova, E. Georgieva, **L. Belenska-Todorova**, D. Kolchakova, B. Dzhabazov, Serum leptin and resistin levels in knee osteoarthritis—Clinical and Radiologic Links: Towards Precise Definition of Metabolic Type Knee Osteoarthritis, *Biomedicines*, vol:9, issue:8, 2021, pages:1-11, <https://doi.org/10.3390/biomedicines9081019> Q1, IF = 6.081, инд. IF = 0.76

Резюме:

Затлъстяването е считано за основен рисков фактор за развитието и прогресията на остеоартрит (ОА) на коляното. То има механичен ефект заради повишеното натоварване върху носещите тежестта стави, но заедно с това се наблюдава връзка с ОА при ставите на ръцете. В последните години значително нараства интересът към ролята на адипокините в патогенезата на ОА. Предполага се, че системният им ефект свързва затлъстяването с ОА.

Целта на настоящото изследване е да бъдат измерени и анализирани серумните нива на лептин и резистин при пациенти с коленен ОА с различни стойности на индекса на телесната маса. В изследването бяха включени седемдесет и три пациента с първичен симптоматичен ОА на възраст между 35 и 87 години (средна възраст 66 години), от които 67 жени и 6 мъже. Пациентите бяха от втори до четвърти радиографски стадий според скалата на Келгрин-Лорънс. 43 пациента бяха със съпътстващо затлъстяване ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$, със средна стойност 38.34 ± 8.20) и 30 пациента с $\text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$ (средна стойност 25.07 ± 2.95). За контролна група бяха изследвани единадесет индивида с различни BMIs , включително такива със затлъстяване, но без радиографски коленен ОА. Серумните нива на лептина и резистина бяха измерени чрез метода ELISA. При пациентите с коленен ОА и $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ серумните нива на лептина ($39.546 \pm 12.918 \text{ ng/mL}$) бяха значително по-високи в сравнение с тези при здрави индивиди ($15.832 \pm 16.531 \text{ ng/mL}$, $p < 0.05$) и при пациентите с нисък BMI ($p < 0.05$). При пациентите с $\text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$ нивата на лептина ($13.010 \pm 10.94 \text{ ng/mL}$) не се отличаваха значително от съответните за контролната група стойности ($p = 0.48$). Серумните нива на резистина бяха също по-високи при пациентите с коленен ОА в сравнение със здравите контроли, но разликата имаше статистическо значение само при пациенти с висок BMI ($2.452 \pm 1.002 \text{ ng/mL}$ в групата с $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$; $2.401 \pm 1.441 \text{ ng/mL}$ при пациенти с $\text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$; $1.610 \pm 1.001 \text{ ng/mL}$ в контролната група, $p < 0.05$). Беше установено наличие на корелация между серумните нива на лептина и радиографския стадий на ОА, напр. по-високи нива на лептин се наблюдаваха в по-напредналите трета и четвърта радиографски фази, докато по отношение на резистина беше наблюдавана корелация в подгрупата пациенти с $\text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$. Серумните нива на лептин и резистин бяха анализирани при пациенти с различни клинични форми на ОА. Нови клинични корелации бяха намерени в настоящото изследване при пациенти с изолиран коленен ОА в сравнение със случаи с друга локализация на заболяването. Пациентите с изолиран коленен ОА бяха значително по-млади и имаха по-висок BMI в

сравнение с такива, при които ОА беше комбиниран с още негови локализации, напр. спондилоартрит ± наличие на тазобедрен ОА и на генерализиран ОА. Тези данни подкрепят хипотезата, че наличието на затлъстяване е предпоставка за по-ранно развитие на коленен ОА като изолирано локализиране на заболяването при по-млади пациенти преди появата на остеоартритни изменения на други места. Нивата на лептина и резистина при изолирания коленен ОА също бяха по-високи. Серумните нива на лептин и резистин в комбинация с клиничните характеристики на пациентите са показателни за наличието на различаващи се клинични и лабораторни профили, чрез които би било възможно да се дефинира по-прецизно метаболитният профил на коленния ОА. Като се вземе пред вид, че затлъстяването е подлежащ на въздействие рисков фактор, който има отражение върху прогресирането на ОА, различни подходи за повлияване на затлъстяването биха предложили възможност за бъдещи терапевтични подходи за това заболяване.

Ключови думи: коленен остеоартрит; адипокини; лептин; резистин; затлъстяване; индекс на телесната маса

Review:

Obesity is considered a major risk factor for the development and progression of knee osteoarthritis (OA). Apart from the mechanical effect of obesity via increase in mechanical overload of weight-bearing joints, an association with hand OA has been observed. There has been increasing interest in the role of adipokines in the pathogenesis of OA in the recent years. It has been suggested that their systemic effects link obesity and OA. In this regard, the aim of the current study was measurement and analysis of serum levels of leptin and resistin in patients with knee OA with different body mass index (BMI). Seventy-three patients with primary symptomatic knee OA at the age between 35 and 87 years (mean age 66 years) were included in the study (67 women and 6 men). The patients were from 2nd to 4th radiographic stage according to Kellgren–Lawrence scale. 43 patients were with concomitant obesity (BMI ≥ 30 kg/m², mean values 38.34 ± 8.20) and 30 patients with BMI < 30 kg/m² (mean values 25.07 ± 2.95). Eleven individuals with different BMIs, including cases with obesity but without radiographic knee OA, were examined as a control group. Serum levels of leptin and resistin were measured via ELISA method. In patients with knee OA and BMI ≥ 30 kg/m², serum levels of leptin (39.546 ± 12.918 ng/mL) were significantly higher as compared with healthy individuals (15.832 ± 16.531 ng/mL, $p < 0.05$) and the patients with low BMI ($p < 0.05$). In patients with BMI < 30 kg/m² the levels of leptin (13.010 ± 10.94 ng/mL) did not differ significantly from the respective values in the control group ($p = 0.48$). Serum levels of resistin were also higher in knee OA patients in comparison with healthy controls, but the difference was statistically significant only for patients with high BMI (2.452 ± 1.002 ng/mL in the group with BMI ≥ 30 kg/m²; 2.401 ± 1.441 ng/mL in patients with BMI < 30 kg/m²; 1.610 ± 1.001 ng/mL in the control group, $p < 0.05$). A correlation was found between the serum levels of leptin and radiographic stage of OA, i.e., higher leptin levels were present in the more advanced 3rd and 4th radiographic stage, while for resistin a correlation was observed in the patient

subgroup with BMI < 30 kg/m². Serum leptin and resistin levels and clinical characteristics were analyzed in patients with different clinical forms of OA. Novel clinical correlations have been found in the current study in patients with isolated knee OA vs. cases with presence of other disease localizations. It has been observed that patients with isolated knee OA were significantly younger and had higher BMI as compared with cases in whom OA is combined with other localizations i.e., spondyloarthritis ± presence of hip OA and with generalized OA. This supports the hypothesis that presence of obesity promotes earlier development of knee OA as an isolated localization of the disease in younger patients before appearance of osteoarthritic changes at other sites. The levels of leptin and resistin in isolated knee OA were also higher. Serum levels of leptin and resistin in combination with patients' clinical characteristics suggest existence of different clinical and laboratory profile through which more precise definition of metabolic phenotype of knee OA would be possible. Considering the fact that obesity is a modifiable risk factor that has an impact on progression of knee OA, different approaches to influence obesity may offer potential for future disease-modifying therapeutic interventions.

Keywords: knee osteoarthritis; adipokines; leptin; resistin; obesity; body mass index

4. **L. Belenska-Todorova**, V. Gyurkovska, N. Ivanovska, Neutralization of Tumour Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand Ameliorates the Symptoms of Zymosan-induced Septic Shock, *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences (Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences)*, vol:74, issue:11, 2021, pages:1684-1693, <https://doi.org/10.7546/CRABS.2021.11.15> Q3, IF = 0.378, инд. IF = 0.126

Резюме:

Септичният шок и увреждането на функциите на органите са най-честите причини за смърт при пациентите със сепсис. Високата смъртност в късния етап на болестта се дължи на колапса на различни органи, съпътстван с развитието на имunosупресия и програмирана клетъчна смърт. Целта на нашата работа беше да изследваме последствията от блокирането на тумор некротизиращия фактор-свързан апоптоза индуциращ лиганд (TRAIL) в миши модел на зимозан-индуциран септичен шок. Перитонеален ексудат и клетки бяха анализирани чрез флоуцитометрия като бяха използвани антитела срещу позитивни за Ly6C и CD11b популации от моноцити/макрофаги. Клетки от слезка и от перитонеален ексудат бяха анализирани за апоптоза/некроза с помощта на анексин V и пропидиев йодид. Резултатите показаха намалена смъртност на клетките, а неутрализирането на TRAIL понижи процента двойнопозитивни за CD11b и Ly6C възпалителни клетки и дела на апоптичните и некротични клетки в перитонеума и слезката. Използването на антитела срещу TRAIL намали увреждането на слезката в ранните етапи, както и развитието на спленомегалия през фазата на синдрома на мултиорганна дисфункция. Нашите резултати демонстрираха, че блокирането на TRAIL в момента на индуциране на сепсис може да намали силата на симптомите главно чрез потискане на ускорената апоптоза в перитонеалния ексудат и слезката.

Ключови думи: TRAIL, зимозан-индуциран септичен шок, сепсис, апоптоза

Review:

Septic shock and multi-organ failure are the most frequent reasons that cause death in patients with sepsis. High rate of mortality at the late phase of disease leads to disabling of various organs accompanied by immunosuppression and programmed cell death. The present work aimed to investigate the consequences of blocking of Tumour Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) in a mouse model of zymosan-induced septic shock. Peritoneal exudate and cells were assessed by flow cytometry analyses using antibodies against Ly6C and CD11b monocyte/macrophage populations. Spleen and peritoneal exudate cells were analyzed for apoptosis/necrosis using Annexin V/propidium iodide kit. The results showed that mortality was decreased and TRAIL neutralization lowered the percentage of CD11b+/Ly6C+ inflammatory cells and apoptotic/necrotic cells in peritoneum and spleen. Anti-TRAIL treatment reduced spleen injury at the early stage, as well as splenomegaly at the phase of multiple organ dysfunction syndrome (MODS). Our results demonstrated that blocking of TRAIL at the point of sepsis induction might mitigate the disease symptoms mainly through suppression of accelerated apoptosis in peritoneal exudate and spleen.

Key words: TRAIL, zymosan-induced septic shock, sepsis, apoptosis

5. I. Maslarski, **L. Belenska-Todorova**, Variants of mastoid and occipital emissary foramens and their clinical correlation, Journal of IMAB - Annual Proceeding (Scientific Papers), vol:27, issue:4, 2021, pages:4004-4009, <https://doi.org/10.5272/jimab.2021274.4004>, Q3

Резюме:

Емисарните отвори в черепа и респективно емисарните вени са познати отдавна, но често тяхното значение е пренебрегвано. Обичайно в атласите по анатомия и в хирургичните ръководства тези черепни отвори са отбелязвани, като „случайни“ или без значение. В настоящата статия са представени няколко варианта на тилните емисарни отвори (occipital emissary foramens), едностранно разположени вляво и близо до тилния кондил във формация от три отвора, които общо се отварят в синус близо до кливуса. Представени са анатомично значими варианти на мастоидния емисарен отвор, като в конкретния случай те са няколко и са разположени в две групи от по два отвора. Дискутирано е клиничното значение на емисарните вени и то е сравнено със съвременния опит в тази насока. Представени са окципиталните и мастоидните емисарни отвори като важни маркери за откриване на дуралния венозен синус. Последните, заедно с епидуралните вени, осигуряват важен механизъм за понижаване на вътречерепното налягане. Липсата на клапен апарат и на мускулни стени при вените не благоприятства регулирането на вътречерепното налягане. Еволюционното развитие на хоминидите и наличието на изправен стоеж засилва появата на емисарните вариации на вените, които водят до охлаждане на венозната кръв и представляват алтернативен път за разпространение на инфекции и тумори. В статията разглеждаме възможността за налични разширения на вените, като предизвикани от артерио-венозни фистули и

патологията свързана с нея. Приложение на емисарните вени може да бъде намерено в образната диагностика, като важно изследване преди хирургична намеса чрез латерален и транскондиларен подход за достъп към форамен магнум.

Review:

Purpose: Emissary foramina in the skull and emissary veins (EV), respectively, have been known for a long time but their importance is often disregarded. In the present study, we introduce variants of occipital emissary foramina (OEF) unilaterally located on the left, close to occipital condyle in a formation of three apertures that open together in a sinus near clivus.

Material/Methods: Corpses of 30 dead people were dissected in the Department of Anatomy and standard techniques for soft tissue separation or maceration of the skull were used. After the removal of calvaria, fixed bones of the skull were disarticulated. Foramina were cleaned using a double-ended probe and depth and diameter measurements were performed using anatomical caliper.

Results: We found variants of mastoid emissary foramina (MEF) situated into two groups each of couple of foramina. Their clinical significance is discussed, compared with existing experience and analysis of their phylogeny and embryogenesis.

Conclusion: We introduce OEF and MEF to be important markers for detection of dural venous sinuses (DVS). The latter, together with EV, provide an important mechanism for decreasing intracranial pressure. This happens due to the absence of a valve apparatus in the veins of the brain, and the lack, or small amount, of muscle tissue. There is possibility of existing varicose veins, such as those caused by arterio-venous fistulas and the pathology associated with it. We suggest application of EV in imaging, as an important study before surgery by lateral and transcondylar approach to anterior foramen magnum.

Keywords: emissary veins, arteriovenous fistula, dural venous sinuses, intracranial pressure

6. **L. Belenska-Todorova**, R. Zhivkova, M. Markova, N. Ivanovska Follicle stimulating hormone and estradiol alter immune response in osteoarthritic mice in an opposite manner, *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, том 35, 2021, стр.: 1-14, <https://doi.org/10.1177/20587384211016198> Q2, IF = 3.167, инд. IF = 0.79

Резюме:

Редица изследвания показват, че проявата и прогресията на остеоартрита (ОА) се свързва с нарушения във функционирането на ендокринната система, но има малко доказателства за това каква е ролята на половите хормони. Целта на настоящото изследване е да се проучи какъв капацитет имат 17β -естрадиолът и фоликулостимулиращият хормон (ФСХ) да изменят диференциацията на костномозъчните (КМ) клетки при артритни мишки. Експериментите бяха проведени с колагеназа-идуциран остеоартрит при мишки. Разрушаването на хрущяла беше определено чрез оцветяване със сафранин и толуидиново синьо. За определянето на различните популации от КМ и синовиални клетки беше използвана флоуцитометрия. Влиянието на ФСХ и ЕД върху

остеокластогенезата беше проучено в КМ култури, а върху остеобластогенезата в първични култури от калвария. Нивата на IL-8, TNF- α , ФСХ и остеокалцина бяха определени чрез ELISA. ФСХ усили разрушаването на хрущяла и повиши нивата на остеокалцина в серума, докато ЕД го намали и понижи нивата на остеокалцин в серума. ФСХ повиши дела на CD14+/RANK+ моноцитоподобни и на CD19+/RANK+ В-клетки, за разлика от ЕД, който потисна натрупването на тези остеогенни популации. ЕД увеличи дела на CD105+/F4/80+ и CD11c+ клетки в синовиума. ФСХ усили, а ЕД потисна образуването на остеокласти чрез макрофаг-колониостимулиращия фактор (M-CSF) и рецептор активирация ядрен фактор- κ B лиганд (RANKL)-индуцирана остеокластогенеза, като това корелираше съответно с увеличаването или с намаляването на секрецията на IL-8. ФСХ не повлия на образуването на остеобласти, докато ЕД усили този процес, като това беше свързано с промени в продукцията на TNF- α , IL-8 и остеокалцин. ЕД намали броя на остеокластите в костта. Изводът от проведеното изследване е, че и двата хормона оказват влияние на диференциацията на КМ клетки, като ФСХ подпомага образуването на остеокласти, а ЕД – натрупването на остеобласти.

Ключови думи: колагеназа-индуциран остеоартрит, 17 β -естрадиол, фоликулостимулиращ хормон, остеобласти, остеокласти.

Abstract

Although a number of studies have shown that the occurrence and progression of osteoarthritis (OA) is related to endocrine system dysfunction, there is limited evidence about what roles sex hormones play. The aim of the present study was to examine the capacity of 17 β -estradiol (ED) and follicle stimulating hormone (FSH) to alter the differentiation of bone marrow (BM) cells in arthritic mice. The experiments were conducted in collagenase-induced osteoarthritis in mice. Cartilage degradation was observed by safranin and toluidine blue staining. Flow cytometry was used to define different BM and synovial cell populations. The influence of FSH and ED on osteoclastogenesis was studied in BM cultures and on the osteoblastogenesis in primary calvarial cultures. The levels of IL-8, TNF- α , FSH, and osteocalcin were estimated by ELISA. FSH increased cartilage degradation and serum osteocalcin levels, while ED abolished it and lowered serum osteocalcin. FSH elevated the percentage of monocytoid CD14+/RANK+ and B cell CD19+/RANK+ cells in contrast to ED which inhibited the accumulation of these osteogenic populations. Also, ED changed the percentage of CD105+/F4/80+ and CD11c+ cells in the synovium. FSH augmented and ED suppressed macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)-induced osteoclast (OC) formation, and this correlated with a respective increase and decrease of IL-8 secretion. FSH did not influence osteoblast (OB) formation while ED enhanced this process in association with changes of TNF- α , IL-8, and osteocalcin production. ED reduced osteoclast generation in bone. The key outcome of the current study is that both hormones influenced BM cell differentiation, with FSH favoring osteoclast formation and ED favoring osteoblast accumulation.

Keywords

collagenase-induced osteoarthritis, 17 β -estradiol, follicle stimulating hormone, osteoblasts, osteoclasts

7. P. Ganova, V. Gyurkovska, **L. Belenska-Todorova**, N. Ivanovska, Functional complement activity is decisive for the development of chronic synovitis, osteophyte formation and processes of cell senescence in zymosan-induced arthritis, *Immunology Letters*, том:190, 2017, стр.:213-220, <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.08.023> Q2, IF = 3.685, инд. IF = 0.92

Резюме:

Възпалението на синовиума има критична роля за симптомите и прогресията на артрит и води до необратимо увреждане на подлежащия хрущял и костта. Активирането на комплемента е силно застъпено като фактор в патогенезата на хроничния синовит при човешкия ревматоиден артрит (РА). В настоящото изследване демонстрираме, че изчерпването на функционалната активност на комплемента в момента на инициране на зимозан-индуцирания артрит, значително понижава експресията на TGF- β 1/3, BMP2 и pSmad2 и намалява броя на позитивните клетки за Суданово черно В в синовиума. Също така, прекомерната синтеза на протеогликани и глюкозаминогликани е значително намалена. При мишките с изчерпан комплемент не се наблюдава поява на апоптични и сенилни клетки сред прикрепените костномозъчни клетки, култивирани *in vitro*. Следователно липсата на функционален комплемент предотвратява развитието на хроничен синовит, образуването на остеофити и образуването на патологични сенилни артритни клетки.

Ключови думи: система на комплемента, зимозан-индуциран артрит, синовит, остеофити, сенилни клетки

Review:

Synovial inflammation plays a critical role in the symptoms and structural progression of arthritis which leads to irreversible damage of the adjacent cartilage and bone. Activation of complement system is strongly implicated as a factor in the pathogenesis of chronic synovitis in human rheumatoid arthritis (RA). In this study, we show that the depletion of functional complement activity at the time of the initiation of zymosan-induced arthritis, significantly reduced the expression of TGF- β 1/3, BMP2 and pSmad2 and decreased the number of Sudan Black B positive cells in the synovium. Also, the excessive synthesis of proteoglycans and glycosaminoglycans was diminished. The appearance of apoptotic and senescent cells among the adherent bone marrow cells cultivated *in vitro* was not observed in complement depleted mice. Therefore, the lack of functional complement prevented the development of chronic synovitis, osteophyte formation and the generation of pathologic senescent arthritic cells.

Keywords: Complement system, Zymosan-induced arthritis, Synovitis, Osteophytes, Senescent cells

8. I. Maslarski, **L. Belenska**, The papillary images as part of the twin method, *Acta morphologica et anthropologica*, том: 22, 2015, стр.: 88-96, <http://www.iempam.bas.bg/journals/acta/acta22/88-96.pdf>; списанието е реферирано в Web of Science, но е без кватил и без IF

Резюме:

„Методът на близнаците“ намира приложение в изясняването на влиянието на околната среда върху генетичните фактори при формирането на различни заболявания, поведението и нивото на интелигентност. За целите на изследването чрез стандартен метод бяха събрани отпечатъци от пръстите и дланите на двете ръце на 21 двойки монозиготни (МЗ) близнаци и 22 двойки дизиготни (ДЗ) близнаци предимно в района на град Шумен, България. Разпределението на улнарните примки на пръстите при МЗ и ДЗ близнаци показва, че честотата им е най-висока на 5-та дистална фаланга (87,5% при МЗ близнаци и 69,04% при ДЗ близнаци). Процентът на спиралите в сравнение с други изображения на пръстови отпечатъци е по-голям при ДЗ близнаци (40,47%), в сравнение с МЗ близнаци (29,77%). Разликата в зиготността може да се наблюдава в трирадиусите t' , t'' и 0.

Ключови думи: монозиготни близнаци, дизиготни близнаци, папиларни изображения, метод на близнаците, хипотенарни изображения.

Review:

The “Twin Method” is attempting to answer questions linked with the extent of influence of genetic information as opposed to the environment over various diseases, behaviors and level of intelligence. The material of the study included palm prints of both hands of 21 pairs of MZ twins and 22 pairs of DZ twins. Most data was collected in the area surrounding the town of Shumen, Bulgaria. Fingerprints and palms were obtained by a standard method. The distribution of ulnar loops on fingers in MZ and DZ twins shows that its frequency is the highest on the 5th distal phalanx (87.5% in MZ twins and 69.04% in DZ twins). The percentage of spirals compared to other fingerprint images is greater in DZ twins (40.47%) than in MZ twins (29.77%). The difference in zygoty can be observed in triradii t' , t'' , 0.

Key words: monozygotic twins, dizygotic twins, papillary images, twin method, hypothenar image.

V. ПУБЛИКАЦИИ ГРУПА Г.8 Публикувана глава от книга или колективна монография

1. **L. Belenska-Todorova**, N. Ivanovska, Influence of depleted complement activity on the development of zymosan-induced arthritis, Book Publisher International, Highlights on Medicine and Medical Research, vol.4, Chapter 9, p. 68-78; 2021; ISSN (print):DOI: 10.9734/bpi/hmmr/v4/1658C, ISSN (online):DOI: 10.9734/bpi/hmmr/v4/1658C, ISBN:DOI: <https://doi.org/10.9734/bpi/hmmr/v4/1658C>, <https://stm.bookpi.org/HMMR-V4/article/view/558>

Резюме:

Зимозан-индуцираният артрит е експериментален модел на ревматоиден артрит, използван за анализ на клетките и молекулите, които имат роля в патогенезата на възпалителните ставни заболявания. Алтернативният път на комплемента участва в патогенезата на артритата, но все още остават неизяснени много въпроси. Целта на настоящото изследване беше да се определи какъв е ефектът на изчерпването на серумната активност на комплемента върху целостта на хрущяла, експресията на дектин-1 и апоптозата на моноцитите и лимфоцитите в кръвта. Декомплементирането беше осъществено чрез кобра веном фактор (cobra venom factor, CVF). Той представлява пептиден фрагмент аналогичен на C3 компонента, който активира алтернативния път на комплемента. Установихме, че третирането с CVF редуцира загубата на протеогликани и влияе на експресията на дектин-1 върху моноцитите и лимфоцитите, както и че намалява броя на дендритните клетки в синовиалната течност. Успехът на инхибирането на комплемента при експерименталните модели е окуражаващ за разработването на нови терапевтични подходи за лечението на ревматоидния артрит при човека.

Ключови думи: комплемент, дектин-1, ревматоиден артрит, зимозан-индуциран артрит

Review:

Zymosan-induced arthritis is an experimental model of rheumatoid arthritis used for analyzing cells and molecules that mediate the pathogenesis of inflammatory joint diseases. Although the alternative pathway of complement activity is involved in the pathogenesis of arthritis, many issues are not well elucidated. The aim of the present study was to evaluate the effect of complement depletion on cartilage integrity, Dectin-1 expression and apoptosis of blood monocytes and lymphocytes. The decompementation was performed using cobra venom factor (CVF), a peptide fragment analogous to C3 component, which is capable of activating the alternative complement pathway. We established that CVF treatment reduced proteoglycan loss and differentially affected Dectin-1 expression on monocyte and lymphocyte populations along with decreased number of dendritic cells (DCs) in the synovial fluid. Success of complement inhibition in the experimental models encourages novel therapeutic approaches to the treatment of human rheumatoid arthritis.

Keywords: Complement; Dectin-1; rheumatoid arthritis; zymosan-induced arthritis.

2. **L. Belenska-Todorova**, N. Ivanovska, Joint Remodeling Molecules and Complement Components in Septic Arthritis *Book Publisher International, Recent Progress in Microbiology and Biotechnology*, vol. 6, p. 74-89, 2021; ISSN (print):978-93-91215-66-8 (print) 978-93-91215-71-2 (e-book), ISSN (online):978-93-91215-66-8 (print) 978-93-91215-71-2 (e-book), ISBN:978-93-91215-66-8 (print) 978-93-91215-71-2 (e-book), <https://stm.bookpi.org/RPMB-V6/article/view/1679>

Резюме:

Септичният артрит (СА) е известен още като инфекциозен артрит и за разлика от някои други възпалителни ставни заболявания, се причинява от вируси, бактерии и гъби. Тези микроорганизми се разпространяват в ставите от вече съществуващ техен фокус в организма чрез кръвообращението или навлизат през рана при нараняване или хирургична интервенция на ставата. Патогенезата на СА се дължи на специфични взаимодействия на микроорганизмите и гостоприемника им и най-вече с неговата имунна система. Анализирахме наличните литературни данни за някои инфекции, при които се произвеждат молекулни фактори, известни също и с това, че участват в ремоделиращите процеси при артрит. Оценихме ролята на компонентите на системата на комплемента и на конкретни маркери за ставно ремоделиране, като трансформация растежен фактор бета (TGF- β), костния морфогенен протеин (BMP), остеопротегерин/ рецептор активатор на ядрения фактор κ B/ лиганд на рецептор активатор на ядрения фактор κ B (OPG/RANK/RANKL) и склеростина в патогенезата на септичния артрит. Дискутирахме възможни терапевтични стратегии, насочени срещу тези молекули с цел намаляване на деструктивните възпалителни отговори в ставите по време на инфекции.

Ключови думи: инфекциозен артрит, система на комплемента, TGF- β ; BMP; склеростин; RANKL

Review:

Septic arthritis (SA) is also known as infectious arthritis and unlike other inflammatory joint diseases, it is caused by viruses, bacteria, and fungi. These microorganisms spread to the joints from an existing focus in the body through the bloodstream or enter through a wound in case of injury or surgical intervention of the joint. Pathogenesis of SA is due to specific interactions of the microorganism and the host, especially its immune system. We analyzed the available data in literature about some infections in which molecular factors are produced that are also known to be involved in remodeling processes of arthritis. We evaluated the role of complement system components and certain joint remodeling markers, such as transforming growth factor beta (TGF- β), bone morphogenic protein (BMP), osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor κ B/ receptor activator of nuclear factor κ B ligand (OPG/RANK/RANKL) and sclerostin in pathogenesis of septic arthritis. We discuss possible treatment strategies based on targeting of these molecules for reduction of inflammatory destructive response in the joints during infections.

Keywords: Infectious arthritis; complement system; TGF- β ; BMP; sclerostin; RANKL

3. **L. Belenska-Todorova**, N. Ivanovska, Influence of berberine on megakaryocyte and apoptotic cell populations in erosive arthritis, Book Publisher International Technological Innovation in Pharmaceutical Research Vol. 1, chapter 9, p. 102-114; ISSN (print):DOI: 10.9734/bpi/tipr/v1/2269E, ISSN (online):DOI: 10.9734/bpi/tipr/v1/2269E, ISBN:DOI: 10.9734/bpi/tipr/v1/2269E, <https://stm.bookpi.org/TIPR-V1/article/view/322>

Резюме:

Берберинът е протоберберинов алкалоид с широк спектър на фармакологично действие и е считан за инхибитор на Janus киназите 2/3 (Jak)2/3. Механизмът на действие на берберина при възпалителните ставни заболявания все още не е изяснен.

Цел: Изследвахме ефекта на берберина върху апоптозата и образуването на сенилни клетки.

Методология: Експериментите бяха проведени върху миши модел на ерозивен артрит, индуциран чрез вътреставно инжектиране на зимозан (зимозан-индуциран артрит, ЗИА). Хистопатологичните изменения бяха оценени след оцветяване със суданово черно В Sudan Black B (SBB). Диференциацията на костномозъчни клетки беше определена чрез оцветяване за TRAP и β -галактозидаза. Апоптозата и експресията на Bcl-2 и Bax беше определена флуоцитометрично.

Резултати: Берберинът намали образуването на апоптични и сенилни клетки в костния мозък и костта, както и образуването на TRAIL-индуцирени остеокласти. Алкалоидът не промени експресията на анти-апоптичния фактор Bcl-2 и повиши експресията на про-апоптичния фактор Bax в синовиалните клетки. Берберинът потисна повишаването на броя мегакариоцити в костния мозък.

Заключение: Берберинът ограничи ускореното образуване на апоптични и сенилни клетки в мишките с артрит, което би могло да има облекчаващ ефект върху ставното възпаление.

Ключови думи: берберин, зимозан-индуциран артрит, апоптоза, TRAIL

Review:

Background: Berberine is a protoberberine alkaloid with a wide spectrum of pharmacological activities considered to be a Janus kinase (Jak)2/3 inhibitor. Nevertheless, the mechanisms of berberine's actions on joint inflammation have not been well clarified.

Aim: This study evaluated the effect of berberine on the processes of apoptosis and on the generation of senescent cells.

Methodology: The experiments were conducted in a murine model of erosive arthritis induced by intra-articular (i.a.) injection of zymosan (zymosan-induced arthritis, ZIA). Histopathologic changes were evaluated by Sudan Black B (SBB) staining. Bone marrow (BM) cell differentiation was assessed by α and β -galactosidase staining. The apoptosis and the expression of Bcl-2 and Bax was determined by flowcytometry.

Results: Berberine decreased the generation of apoptotic and senescent cells in BM and bone, and lowered TRAIL-induced osteoclast formation. The alkaloid did not change the expression

of antiapoptotic Bcl-2 and increased the expression of pro-apoptotic Bax in synovial cells. Berberine inhibited the elevation of megakaryocyte number in BM.

Conclusion: Berberine limited the accelerated generation of apoptotic and senescent cells in arthritic mice that may result in amelioration of joint inflammation.

Keywords: Berberine; zymosan-induced arthritis; apoptosis; TRAIL.

4. **L. Belenska-Todorova**, N. Ivanovska, Megakaryocytes distribution and their presumable role in bone homeostasis of inflammatory joint disease *Book Publisher International, Research Trends and Challenges in Medical Science* Vol. 6, Book chapter 7; ISSN (print): 978-93-90206-91-9 , ISSN (online): 978-93-90206-91-9 , ISBN: 978-93-90206-91-9, <https://doi.org/10.9734/bpi/rtcms/v6>, <https://bp.bookpi.org/index.php/bpi/catalog/book/313>

Резюме:

Възпалителните ставни заболявания се характеризират със значително разрушаване на костта и хрущяла, водещи до инвалидност и намалено качество на живот. Някои от тези заболявания имат системен характер, застрашаващ живота. Точните механизми на ставната патология, все още не са изяснени, тъй като в тях участват голямо разнообразие от различни типове клетки. Все повече данни показват, че мегакариоцитите и тромбоцитите имат ключова роля във възпалението на ставите и ремоделирането на костите и в съпътстващите ги системни нарушения като тромбоцитозата. Тук ние обобщаваме наличните данни за мегакариопоезата, разпространението на мегакариоцитите и дискутираме някои аспекти на участието им във възпалителните ставни заболявания.

Ключови думи: мегакариоцити, мегакариопоеза, възпалителни ставни заболявания, артрит

Review:

Inflammatory joint diseases are characterised by significant bone and cartilage destruction, leading to disability and reduced life quality. Some of these illnesses have a systemic character which leads to life-threatening conditions. The exact mechanisms that are involved in joint pathology are still not yet known, as a variety of cell types are implicated in them. Increasing evidence shows that megakaryocytes and platelets are key players in joint inflammation and bone remodeling, and in the accompanying systemic disorders such as thrombocytosis. Here we summarise the available data on the megakaryopoiesis, megakaryocyte distribution and discuss some aspects of their involvement in inflammatory joint diseases.

Keywords: Megakaryocytes; megakaryopoiesis; inflammatory joint diseases; arthritis.

5. **L. Belenska-Todorova**, P. Ganova , V. Gyurkovska , N. Ivanovska, Book: Osteoarthritis, Chapter: Complement system involvement in osteoarthritis pathology, MedDocs Publishers LLC eBooks, <https://meddocsonline.org/ebooks/osteoarthritis/OST-18-03.pdf>

Резюме: Остеоартритът (ОА) се характеризира с постепенно развиваща се загуба на хрущял, която по време на стационарната фаза от прогресията на заболяването довежда до образуване на остеофити и стесняване на вътреставното пространство, а в крайната фаза се осъществява поправка и ремоделиране на костта. Множество фактори допринасят за разрушаването на хрущяла при ОА, пряко или непряко чрез регулиране на анаболитните и катаболитните пътища в матрикса на хрущяла. Системата на комплемента се състои от над 50 разтворими и мембранно свързани серумни белтъци, които обединяват вродения и придобития имунитет. Действието на каскадата на комплемента е неотменна част от много автоимунни и възпалителни заболявания, включително ОА. Образованите анафилатоксини C3a и C5a се свързват с техните рецептори C3aR и C5aR с висок афинитет и оказват влияние върху много клетъчни дейности. Те допринасят за поддържането на възпалението на ставите при ОА, довеждайки до развитието на синовит, деструкция на хрущяла и образуване на остеокласти. Тъй като съвременното лечение на ОА действа само върху симптомите, но не предотвратява и не премахва ОА, системата на комплемента се оказва атрактивна цел за модулиране на дегенерацията на хрущяла и за разработването на нови терапевтични подходи. Колагеназа-индуцираният остеоартрит (КИОА) при мишки е обсъждан като подходящ модел на ОА. Този модел може да бъде използван за изследване ролята на системата на комплемента, експресията на склеростина и клетъчното стареене.

Review: Osteoarthritis (OA) is associated with gradually developing loss of cartilage, which in the stationary phase of disease progression leads to the formation of osteophytes and joint space narrowing, and in the last phase results in bone repair and remodeling. Multiple factors contribute to the degradation of cartilage in OA, by either directly or indirectly regulating the anabolic and catabolic pathways of the cartilage matrix. Complement system consists of more than 50 soluble and membrane-bound serum proteins that connects innate and acquired immunity. The activation of complement cascade is indispensable part of many autoimmune and inflammatory diseases, including OA. The generated anaphylatoxins C3a and C5a bind to their receptors C3aR and C5aR with high affinity and influence many cell activities. They contribute to maintenance of osteoarthritic joint inflammation leading to synovitis, cartilage destruction, and osteoclast formation. Because current treatments for OA act only on symptoms and do not prevent or cure OA, complement system is an attractive target to modulate cartilage degeneration and help the development of new therapeutic approaches. Collagenase-induced osteoarthritis in mice (CIOA) is discussed as an appropriate model of OA. Except, this model might be used for studies on the role of complement system, sclerostin expression and cell senescence.

VI. Публикации в нереферирани списания с научно рецензиране извън дисертационния труд за придобиване на ОНС „Доктор“

1. **L. Belenska-Todorova**, P. Ganova, N. Ivanovska, In vivo elucidation of anti-arthritic effect of plant alkaloid berberine in experimental mouse joint inflammation, *SCIERA journal of biology*, том:4, брой:1, 2019, стр.:1-15 <http://article.scirea.org/pdf/18025.pdf>

Резюме:

Берберинът е протоберберинов алкалоид с разнообразни фармакологични действия, известен като инхибитор на Janus киназите (JAK). Целта на настоящото изследване е да бъде изяснен механизмът на действието му по отношение на JAK2/3 и на експресията на склеростин в синовиума и хрущяла, на наличието на позитивни клетки за лиганда на рецептор активатора на фактор kB (RANKL) в синовиалната течност, на наличието на дендритни клетки (ДК) в хрущяла и на експресията на TNF-свързания апоптоза индуциращ лиганд (TRAIL), както и на неговия рецептор DR5 върху кстномозъчните (КМ) клетки. Експериментите бяха проведени в миши модел на ерозивно възпалително ставно заболяване, съпоставимо с ревматоидния артрит при човека и индуцирано чрез вътреставно инжектиране на зимозан. Берберинът намали фосфорилирането едновременно на JAK2 и JAK3 в артритните стави, а също и експресията на RANKL, TRAIL и DR5. Този алкалоид не повлия на експресията на склеростин и предотврати намаляването на броя 33D1 положителните дендритни клетки. Нашите резултати допринасят за по-ясното разбиране на облекчаващия ефект на берберина върху ерозивните процеси при възпалението на ставите.

Review:

Berberine is a protoberberine alkaloid possessing various pharmacological activities, known as a Janus kinase (JAK) inhibitor. The aim of the present study was to elucidate the mechanism of its action in relation to JAK2/3 and sclerostin expression in synovium and cartilage, the presence of Receptor activator of factor kB Ligand (RANKL) positive cells in synovial fluid, the presence of dendritic cells (DC) in cartilage and the expression of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and its receptor DR5 on bone marrow (BM) cells. The experiments were conducted in a mouse model of erosive inflammatory joint disease, relevant to human rheumatoid arthritis, induced through intraarticular injection of zymosan. Berberine decreased the phosphorylation of both JAK2 and JAK3 in arthritic joints, the expression of RANKL, TRAIL and DR5. The alkaloid did not affect sclerostin expression and prevented the decrease of the number of 33D1 positive dendritic cells. Present results contribute to more clear understanding of the ameliorative effect of berberine on erosive processes in joint inflammation.

Keywords: berberine, JAK inhibitors, erosive arthritis, dendritic cells

2. **L. Belenska-Todorova**, Emerging Concepts of Megakaryocytes Distribution and Role in Inflammatory Joint Disease, *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, том:27, брой:11, 2018, стр.:1-13, DOI: 10.9734/JAMMR/2018/44795

Резюме:

Възпалителните ставни заболявания се характеризират със значително разрушаване на костта и хрущяла, водещи до инвалидност и намалено качество на живот. Някои от тези заболявания имат системен характер, застрашаващ живота. Точните механизми на ставната патология, все още не са изяснени, тъй като в тях участват голямо разнообразие от различни типове клетки. Все повече данни показват, че мегакариоцитите и тромбоцитите имат ключова роля във възпалението на ставите и ремоделирането на костите и в съпътстващите ги системни нарушения като тромбоцитозата. Тук ние обобщаваме наличните данни за мегакариопоезата, разпространението на мегакариоцитите и дискутираме някои аспекти на участието им във възпалителните ставни заболявания.

Ключови думи: мегакариоцити, мегакариопоеза, възпалителни ставни заболявания, артрит

Review:

Inflammatory joint diseases are characterised by significant bone and cartilage destruction, leading to disability and reduced life quality. Some of these illnesses have a systemic character which leads to life-threatening conditions. The exact mechanisms that are involved in joint pathology are still not yet known, as a variety of cell types are implicated in them. Increasing evidence shows that megakaryocytes and platelets are key players in joint inflammation and bone remodeling, and in the accompanying systemic disorders such as thrombocytosis. Here we summarise the available data on the megakaryopoiesis, megakaryocyte distribution and discuss some aspects of their involvement in inflammatory joint diseases.

Keywords: Megakaryocytes; megakaryopoiesis; inflammatory joint diseases; arthritis.

3. P. Ganova, V. Gyurkovska, **L. Belenska-Todorova**, N. Ivanovska, Low complement activity increases the survival in experimental aseptic shock, *Current trends in microbiology*, том:12 2018, стр.: 55-65, <http://www.researchtrends.net/tia/abstract.asp?in=0&vn=12&tid=41&aid=6225&pub=2018&type=>

Резюме:

Септичният шок е критично клинично състояние с висока смъртност. Докато комплементът е важен за защитата срещу бактериални инфекции, много клинични изследвания показват, че активирането на факторите на комплемента е свързано с настъпването на разрушителни събития по време на септичния шок, като мултиорганни увреждания и летален изход. Прякото и непрякото инхибиране на комплемента може да

бъде в основата на нови подходи в лечението на септичния шок. В настоящото изследване за определянето ролята на комплемента в зимозан-индуциран септичен шок при мишки използвахме модел на изтощаване серумната активност на комплемента чрез инжектиране на кобра веном фактор (cobra venom factor, CVF). Резултатите показаха, че ниската активност на комплемента по времето на иницирането на шока, повишава броя на оцелелите, предотвратява разрастването на черния дроб и намалява покачването нивата на серумните маркери за чернодробно увреждане на 48-мия час. Повишението на дела на Ly6C+ клетките в перитонеалния ексудат (ПЕ) беше ограничено като резултат от предварителното третиране с CVF. Апоптозата в ПЕ и слезката беше потисната при животните с изтощен комплемент и нивата на IL-6 в ПЕ и слезката бяха ограничени. В по-късните етапи оцелелите мишки не развиха чернодробна недостатъчност, за разлика от нетеретираните с CVF. Следователно разгадаването на механизмите на активирането на комплемента по време на сепсиса е важно за разработването на нови терапевтични подходи.

Review:

Septic shock is a critical clinical condition with a high mortality rate. While complement is an important defense system against bacterial infection, many clinical observations suggest that activation of complement factors is associated with detrimental effects in septic shock, such as multiorgan damages and poor outcome. Direct or indirect inhibition of complement may provide new approaches in managing septic shock. In the present study, we used a model of complement depletion by injection of cobra venom factor (CVF) to investigate the role of complement in zymosan-induced septic shock in mice. The results showed that the low complement activity at the time of shock initiation raised the number of survivors, prevented liver enlargement and lowered the increase of serum markers for liver injury at the 48th hour. The elevated percentage of Ly6C+ cells in the peritoneal exudate (PE) was diminished as a result of CVF-pretreatment. Also, the degree of apoptosis in PE and spleen was inhibited in complement-depleted animals and the levels of IL-6 in PE and plasma were suppressed. At late period survivors did not develop liver dysfunction compared to mice untreated with CVF. Therefore, an understanding of the mechanisms involved in the activation of complement during sepsis is essential for introducing new rational therapies.

4. P. Ganova, **L. Belenska-Todorova**, T. Doncheva, N. Ivanovska, Berberine prevents bone and cartilage destruction and influences cell senescence in experimental arthritis, *Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences*, том:15, брой:3, 2017, стр.:1-8, DOI: <https://doi.org/10.9734/JAMPS/2017/37839>

Резюме:

Берберинът е протоберберинов алкалоид с широк спектър от фармакологични активности, считан за селективен инхибитор на Янус киназа Jak3. Независимо от това, механизмите на действието на берберина върху ставните възпаления не са добре изяснени.

Цел: Това проучване оценява ефекта на берберина върху разрушаването на хрущяла и костите и върху генерирането на стареещи клетки.

Материали и методи: Експериментите са проведени в миши модел на ерозивен артрит, предизвикан от вътреставно (i.a.) инжектиране на зимозан (зимозан-индуциран артрит, ZIA). Хистопатологичните промени бяха оценени чрез оцветяване с хематоксилин и еозин (H&E), толуидиново синьо и Суданово черно В (SBB).

Клетките от костен мозък (КМ) взети от калвария бяха изместени към остеобластна диференциация. Бяха определени положителните за алкална фосфатаза (ALP) клетки, заедно с активността на ALP в клетъчните лизати. Генерирането на остеобласти от калвария беше определено чрез оцветяване по Фон Коса.

Резултати: Берберинът намалява ерозията на хрущяла и костта. Загубата на гликозаминогликани (GAGs) е по-ниска в групата, третирана с берберин (72,0 +/- 2,9% при ЗИА мишки срещу 25,7 +/- 2,2 в бербериновата група). Берберинът инхибира образуването на стареещи клетки и намалява активността на ALP на тези клетки (0,550 +/- 0,006 за неартритни, 1,725,8 +/- 0,110 за ЗИА и 0,750 +/- 0,0064 за ЗИА+берберин).

Заключение: Берберинът показва потенциални анти-артритни свойства в модел на ерозивен РА, което е перспектива за приложението му при ставни заболявания.

Review:

Background: Berberine (BB) is a protoberberine alkaloid with a wide spectrum of pharmacological activities considered to be a selective Janus kinase (Jak)3 inhibitor. Nevertheless, the mechanisms of berberine's actions on joint inflammation have not been well clarified.

Aim: This study evaluated the effect of berberine on cartilage and bone destruction, and on generation of senescent cells.

Methodology: The experiments were conducted in a murine model of erosive arthritis induced by intra-articular (i.a.) injection of zymosan (zymosan-induced arthritis, ZIA). Histopathologic changes were evaluated by haematoxylin and eosin (H&E), toluidine blue and Sudan Black B (SBB) staining.

Bone marrow (BM) cells were shifted to osteoblast differentiation and alkaline phosphatase (ALP) positive cells were determined together with ALP activity in the cell lysates. Calvarial osteoblast generation was determined by von Cossa staining.

Results: Berberine decreased cartilage and bone erosion. The loss of glycosaminoglycans

(GAGs) was lower in BB-treated group (72.0 +/- 2.9% in ZIA mice vs 25.7 +/- 2.2 in BB group). BB inhibited the generation of senescent cells and decreased the ALP activity of these cells (0.550 +/- 0.006 for non-arthritic, 1.725.8 +/- 0.110 for ZIA and 0.750 +/- 0.0064 for ZIA+BB).

Conclusion: Berberine showed potential anti-arthritic properties in a model of erosive RA perspective for administration in joint disorders.

5. P. Ganova, **L. Belenska-Todorova**, N. Ivanovska, Dendritic cells and TNF-Related apoptosis inducing ligand (TRAIL) represent new possibilities for sepsis treatment, *Insights in Clinical and Cellular Immunology*, 2017, стр.: 1-4, <https://doi.org/10.29328/journal.hcci.1001001>

Резюме:

Сепсисът представлява генерализиран възпалителен отговор на организма към инфекция или към бактериални продукти в кръвообращението, а не е развитие на инфекция сама по себе си. Въпреки напредъка в клиничната практика и цялостните медицински грижи, сепсисът остава голям проблем в здравеопазването и все още е най-честата причина за смърт при критично болни пациенти с инфекция. В настоящото съобщение изказваме предположението, че по време на протичането на сепсис експресията на TRAIL в различни органи корелира с висока смъртност и по-нататъшно развитие на синдром на полиорганна дисфункция (MODS). Очакваме, че дендритните клетки (DCs) при повишена експресия на TRAIL стават мишени за апоптотични процеси. Тази хипотеза е основа за подробни *in vivo* проучвания при животински модели и за *in vitro* проучвания на пациенти със сепсис.

Review:

Sepsis refers to a generalized inflammatory response of the organism to an infection or to bacterial products in circulation, rather than the development of an infection per se. Despite recent advances in clinical practice and overall medical care, sepsis remains a great health care problem and is still the most common cause of death in critically ill patients with infection. We suppose that during the course of sepsis the expression of TRAIL in different organs correlates with acute mortality and further development of multiple organ dysfunction syndrome (MODS). It is expected that dendritic cells (DCs) might become targets for apoptotic processes in a result of elevated TRAIL expression. This hypothesis is a bias for detailed investigations for in vivo studies in animal models and for in vitro studies of septic patients.

6. I. Maslarski, **L. Belenska**, Qualitative analysis of prints of palms and fingers of twins, *Journal of Global Biosciences*, том:4, брой:7, 2015, стр.:2833-2841, <https://www.mutagens.co.in/jgb/vol.04/7/040726.pdf>

Резюме:

Рисунакът на папиларните линии се унаследява полигенно. За анализа на пръстовите отпечатащи по-често се използват качествени показатели. Те са свързани със специфични генетични маркери, които определят рисунъка на папиларните линии. Предполага се, че съществува връзка между качествените показатели и предразположението към различни заболявания или прояви на определено поведение. Анализът на пръстовите отпечатащи е част от метода на близнаците и с него се изследват количествени и качествени признаци. Проведохме анализ на дерматоглифската морфология на дланите монозиготни (МЗ) близнаци и дизиготни (ДЗ) близнаци. Чрез стандартен метод бяха снети отпечатащи от дланите и на двете ръце на 21 двойки МЗ и 22 двойки ДЗ близнаци. Повечето данни бяха събрани в областта на град Шумен, България. Резултатите, получени за разпределението на улнарните примки на пръстите на МЗ и ДЗ, показаха, че те се срещат най-често при петата дистална фаланга. Съотношението на спиралите в сравнение с други пръстови отпечатащи е по-високо при ДЗ, отколкото при МЗ близнаци. Отпечатащът от дланите Au/As е с еднакво висока вероятност за проява и при двете групи. При МЗ близнаци вариабилността на изследваните черти е почти равномерно разпределена, докато при ДЗ близнаци тя е по-висока при второ раждане на ДЗ близнаци.

Ключови думи: монозиготни близнаци, дизиготни близнаци, папиларни изображения, метод на близнаците, хипотенарно изображение.

Review:

There is evidence of polygenic inherited origin of the papillary image. The analysis of fingerprints requires the use of qualitative indicators more common. They are bound by specific genetic markers that define the form of papillary images. The researchers want to find relationships between quality indicators and predisposal to various diseases or the manifestation of different behavior. The fingerprint analysis is part of the "twin method". This method analyses both qualitative and quantitative indicators. At the core of this study is the dermatoglyphic morphology of the hands, represented in two groups: monozygotic twins (MZ) and dizygotic twins (DZ). The material of the study included palm prints of both hands of 21 pairs of MZ twins and 22 pairs of DZ twins. Fingerprints and palms were obtained by a standard method. Most data was collected in the area surrounding the town of Shumen, Bulgaria. Interesting results were obtained for distribution of ulnar loops on fingers in MZ and DZ twins shows that its frequency is the highest on the 5th distal phalanx. The percentage of spirals compared to other fingerprint images is greater in DZ twins than in MZ twins. The palm image Au/As has the highest percent probability of occurrence in both groups. In MZ twins the group variability of researched features is almost evenly distributed, while in DZ twins the variability is higher in the second-born twins.

Key words: monozygotic twins, dizygotic twins, papillary images, twin method, hypothenar image.

7. Marinova Ts., L. Spassov, V. Vlassov, R. Dzhupanova, **L. Belenska**, L. Aloe, Nerve Growth Factor (NGF) immunoreactivity modulation of mast cells in the thymus of subjects with Myasthenia gravis, *Journal of Biomedical and Clinical Research*, том: 4, брой: 2, 2011, стр.: 86-89
https://www.researchgate.net/publication/301790431_Nerve_growth_factor_NGF_immunoreactivity_modulation_of_mast_cells_in_the_thymus_of_subjects_with_myasthenia_gravis

Резюме:

Последните данни показват, че някои тимусни клетки произвеждат NGF и експресират неговите рецептори при нормални и патологични състояния, включително автоимунни заболявания. По-рано съобщавахме, че тимусът на пациенти, засегнати от миастения гравис, се характеризира с повишено ниво на NGF, ендогенен полипептид, важен в клетъчната биология на нервната и имунната система. За да се оценят молекулните механизми, замесени в действието на NGF в човешкия миастеничен тимус, е необходимо да се идентифицира структурната организация на тимуса и клетъчната експресия на NGF и неговите рецептори. Масните клетки участват активно както във физиологичните, така и в патологичните събития в тимуса. Изследвахме клетъчното разпределение на NGF имунопозитивни и анексин V реактивни мастоцити в тимуса на пациенти с миастения гравис на светлинно-микроскопско ниво. В патологичния тимус бяха открити повишена плътност на триптаза имунопозитивни и NGF имунопозитивни мастоцити, както и double NGF/триптаза и анексин/триптаза положителни мастоцити. Нашите данни предоставят оригинални структурни и имуноцитохимични доказателства за модулация на имунореактивността на NGF на мастоцити и повдигат въпроса за ролята на NGF в локалните авто- и/или паракринни регулаторни процеси по време на миастеничната трансформация.

Ключови думи: тимусни мастни клетки, NGF, миастения гравис

Review:

Recent evidence indicates that some thymic cells produce NGF and express its receptors under both normal and pathological conditions, including autoimmune diseases. We have previously reported that the thymus of patients affected by myasthenia gravis is characterized by elevated level of NGF, an endogenous polypeptide important in the cell biology of nervous and immune system. To evaluate molecular mechanisms implicated in NGF action in human myasthenic thymus, it is necessary to identify the thymus structural organization and cellular expression of NGF and its receptors. Mast cells are actively involved in both physiological and pathological events in thymus. We investigated the cellular distribution of NGF immunopositive and Annexin

V reactive mast cells in the thymus of patients with myasthenia gravis at light microscopic level. Increased density of Tryptase immunopositive and NGF immunopositive mast cells, as well as double NGF/tryptase and Annexin/tryptase positive mast cells were detected in pathological thymus. Our data provide original structural and immunocytochemical evidence for NGF immunoreactivity modulation of mast cells and raise the question about the role of NGF in the local auto and/or paracrine regulatory processes during myasthenic transformation.
Key words: thymic mast cells, NGF, myasthenia gravis