

CHIEF ASSISTANT PROFESSOR KALINA AVGUST SHISHKOVA, PhD
LABORATORY OF VIROLOGY
FACULTY OF BIOLOGY, UNIVERSITY OF SOFIA "ST. KL. OHRIDSKI"

THE ABSTRACTS OF THE ARTICLES SUBMITTED FOR PARTICIPATION IN
THE COMPETITION FOR THE ACADEMIC POSITION
"ASSOCIATE PROFESSOR"

1. Stankova, I., K. Chuchkov, K. Kostova, L. Mukova, A. Galabov. 2009. Synthesis, antioxidative and antiviral activity of hydroxycinnamic acid amides of thiazole containing amino acid. *Amino acids*, 37 (2): 383-388. DOI:10.1007/s00726-008-0165-z. IF₂₀₀₉=3.877, SJR₂₀₀₉=0.898; Q2

Abstract: The synthesis and the biological (antioxidant and antiviral) activities of novel hydroxycinnamic acid amides of a thiazole containing TFA.valine-4-carboxylic acid ethyl ester are reported. The amides have been synthesized from p-coumaric, ferulic and sinapic acids with the corresponding TFA.valine-thiazole-4-carboxylic acid ethyl ester using the coupling reagent N-ethyl-N0-(3- dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) and 4-(dimethylamino) pyridine (DMAP) as a catalyst. The antioxidant properties of the newly synthesized amides have been studied for then antioxidative activity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) test. The newly synthesized compounds have been tested against the replication *in vitro* of influenza virus A (H3N2) and human herpes virus 1 and 2 (HSV-1 and HSV-2).

Резюме: Съобщава се за синтеза и биологичната (антиоксидантна и антивирусна) активност на нови амиди на хидроксиканелена киселина на тиазол, съдържащ TFA. етилов естер на валин-4-карбоксилна киселина. Амидите са синтезирани от р-кумарова, ферулова и синапинова киселини със съответния етилов естер на TFA.валин-тиазол-4-карбоксилна киселина, използвайки свързващия реагент N-етил-N0-(3-диметиламинопропил) карбодиимид хидрохлорид (EDC) и 4-(диметиламино) пиридин (DMAP) като катализатор. Антиоксидантните свойства на ново синтезираните амиди са изследвани за антиоксидантна активност с помощта на 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH) тест. Новосинтезираните съединения са тествани срещу репликацията *in vitro* на грипен вирус А (H3N2) и човешки херпесен вирус 1 и 2 (HSV-1 и HSV-2).

2. Dolashka-Angelova, P., L. Velkova, S. Shishkov, K. Kostova, A. Dolashki, I. Dimitrov, B. Atanasov, B. Devreese, W. Voelter, J. Van Beeumen. 2010. Glycan structures and antiviral effect of the structural subunit RvH2of *Rapana hemocyanin*. *Carbohydr. Res.*, 345 (16): 2343-2347. DOI: 10.1016/j.carres.2010.08.005, IF₂₀₁₀=2.025, SJR₂₀₁₀=0.73; Q2.

Abstract: Molluscan hemocyanins are very large biological macromolecules and they act as oxygen-transporting glycoproteins. Most of them are glycoproteins with molecular mass around 9000 kDa. The oligosaccharide structures of the structural subunit RvH2 of *Rapana venosa* hemocyanin (RvH) were studied by sequence analysis of glycans using MALDI-TOF-MS and tandem mass spectrometry on a Q-Trap mass spectrometer after enzymatical

liberation of the N-glycans from the polypeptides. Our study revealed a highly heterogeneous mixture of glycans of the compositions Hex0–9 HexNAc2–4 Hex0–3 Pent0–3 Fuc0–3. A novel type of N-glycan, with an internal fucose residue connecting one GalNAc(b1-2) and one hexuronic acid, was detected, as also occurs in subunit RvH1. A glycan with the same structure but with two deoxyhexose residues was observed as a doubly charged ion. Antiviral effects of the native molecules of RvH and also of *Helix lucorum* hemocyanin (HH), of their structural subunits, and of the glycosylated functional unit RvH2-e and the non-glycosylated unit RvH2-c on HSV virus type 1 were investigated. Only glycosylated FU RvH2-e exhibits this antiviral activity. The carbohydrate chains of the FU are likely to interact with specific regions of glycoproteins of HSV, through van der Waals interactions in general or with certain amino acid residues in particular. Several clusters of these residues can be identified on the surface of RvH2-e.

Резюме: Хемоцианините на мекотелите са много големи биологични макромолекули и действат като гликопротеини, пренасящи кислород. Повечето от тях са гликопротеини с молекулна маса около 9000 kDa. Олигозахаридните структури на структурната субединица RvH2 на *Rapana venosa* hemocyanin (RvH) са изследвани чрез анализ на последователността на гликани с помощта на MALDI-TOF-MS и двумерна маспектрометрия на Q-Трап маспектрометър след ензимно освобождаване на N-гликаните от полипептидите. Нашето проучване разкри силно хетерогенна смес от гликани със съставките Hex0–9 HexNAc2–4 Hex0–3 Pent0–3 Fuc0–3. Беше открит нов тип N-гликан с вътрешен фукозен остатък, свързващ един GalNAc(b1-2) и една хексууронова киселина, както се среща и в субединицата RvH1. Гликан със същата структура, но с два дезоксихексозни остатъка се наблюдава като двойно зареден йон. Изследвани са антивирусните ефекти на нативните молекули на RvH и на *Helix lucorum* hemocyanin (HH), на техните структурни субединици и на гликозилираната функционална единица RvH2-e и негликозилираната единица RvH2-c спрямо HSV вирус тип 1. Само гликозилираният FU RvH2-e проявява тази антивирусна активност. Вероятно е въглехидратните вериги на FU да взаимодействат със специфични региони от гликопротеини на HSV чрез ван дер Ваалсови взаимодействия като цяло или с определени аминокиселинни остатъци в частност. Няколко групи от тези остатъци могат да бъдат идентифицирани на повърхността на RvH2-e.

3. Stankova, I., S. Shishkov, K. Kostova, A. Galabov. 2010. New Analogues of Acyclovir - Synthesis and biological activity. Z. Naturforsch., 65: 29-33; IF₂₀₁₀=0.714, SJR₂₀₁₀=0.397; Q2

Abstract: New acyclovir esters of the peptidomimetics were synthesized and evaluated *in vitro* for their antiviral activity against the replication of Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2). The influence of peptidomimetics containing oxazole and thiazolyl-thiazole moieties on the antiviral activity is also reported. The esters were synthesized using the coupling reagents N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide-hydrochloride (EDC) and N,N-dimethyl-4-aminopyridine (DMAP) as a catalyst.

Резюме: Синтезирани са нови естери на ацикловир с пептидомиметици и са оценени *in vitro* тяхната антивирусна активност срещу репликацията на херпес симплекс вирус тип 1 (HSV-1) и тип 2 (HSV-2). Съобщава се и за влиянието на пептидомиметиците, съдържащи оксазолони и тиазолонил-тиазолони части, върху антивирусната активност. Естерите бяха синтезирани с помощта на свързващите реагенти N-етил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимид хидрохлорид (EDC) и N,N-диметил-4-аминопиридин (DMAP) като катализатор.

4. **Kostova, K., Hinkov, A., Shishkov, S., Todorov, D., Dimitrova, M., Yordanowa, Z., Kapchina-Toteva, V.** 2011. Antiherpes Activities of Some Medical Plants from the Lamiaceae. *Antiviral Res.*, 90 (2): A56. DOI: 10.1016/j.antiviral.2011.03.106 **IF2011=4.301, SJR₂₀₁₁=1.616; Q1.**

Abstract: Chloroform, ethanol, methanol and water extracts, derived from wild and *in vitro* propagated *Lamium album* L. and *Leonorus cardiaca* L. significantly blocked herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) replication in MDBK cells without apparent cytotoxicity. The chloroform extracts had most potent antiviral activity. The 50% effective doses (IC₅₀) of the chloroform extracts from native *L. cardiaca* were identically – 80 mg/ml. The inhibitory effects of the other extracts were similar or slight. The IC₅₀ value on the *in vitro* extracts from *L. album* was 550 mg/ml and 467 mg/ml, respectively and on the *in vivo* extracts were 668 mg/ml and 780 mg/ml. The viral replications were suppressed with 90% after addition of the chloroform extracts in maximal nontoxic concentrations (MNC). The methanol *in vitro* extract and chloroform *in vivo* extract suppressed extracellular HSV-1 above 90% – $\Delta\log 4$ and $\Delta\log 1.5$, respectively.

Резюме: Хлороформни, етанолови, метаноовил и водни екстракти, получени от диви и *in vitro* размножени *Lamium album* L. и *Leonorus cardiaca* L. значително блокират репликацията на херпес симплекс вирус тип 1 (HSV-1) и тип 2 (HSV-2) в MDBK клетки без явна цитотоксичност. Хлороформните екстракти имат най-силно антивирусно действие. 50% ефективни дози (IC₅₀) на хлороформните екстракти от нативен *L. cardiaca* са идентични – 80 mg/ml. Инхибиторните ефекти на другите екстракти са подобни или слаби. Стойността на IC₅₀ за *in vitro* екстрактите от *L. album* е съответно 550 mg/ml и 467 mg/ml, а за *in vivo* екстрактите е 668 mg/ml и 780 mg/ml. Вирусните репликации се потискат с 90% след добавяне на екстракти от хлороформ в максимални нетоксични концентрации (MNC). Екстрактът от метанол *in vitro* и екстрактът от хлороформ *in vivo* потискат извънклетъчния HSV-1 над 90% – съответно $\Delta\log 4$ и $\Delta\log 1,5$.

5. **Todorov, D., M. Dimitrova, K. Shishkova, J. Yordanova, V. Kapchina-Toteva, S. Shishkov.** 2013. Comparative anti-herpes effects of the chloroform *in vitro* and *in vivo* extracts derived from *Lamium album* L. *Bulg. J. Agricultural Sci.*, 19 (2): 190-193. **SJR₂₀₁₄=0.25; Q3**

Abstract: *Lamium album* L. is a valuable medicinal plant which possesses astringent, spasmolytic, anti-inflammatory, antibiotic and bacteriostatic properties. In our study, chloroform extracts derived by Soxhlet extraction from *in vivo* and *in vitro* propagated plants were tested for antiviral activity. The extracts inhibited significantly the replication of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in MDBK cells, without apparent cytotoxicity. The extracts showed strong antiviral effect. The 50% inhibitory concentrations (IC₅₀) of the chloroform *in vitro* extract (CS) were 552 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 487 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. The IC₅₀ of the chloroform *in vivo* extract (CES) were 668 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 780 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. Viral replication was suppressed over 90% when both chloroform extracts were applied at maximal tolerated concentrations (MTC). The data suggested that extracts derived from wild plants have stronger inhibitory effects than *in vitro* extracts. The chloroform *in vivo* extract CES showed strong virucidal effect. The extract applied in MTC inactivated the extracellular HSV-1 after 5 minutes of contact at a rate exceeding 90% ($\Delta\log 1.5$).

Резюме: *Lamium album* L. е ценно лечебно растение, което притежава адстрингентни, спазмолитични, противовъзпалителни, антибиотични и бактериостатични свойства. В нашето изследване екстрактите от хлороформ, получени чрез екстракция на Soxhlet от *in vivo* и *in vitro* размножени растения, бяха тествани за антивирусна активност. Екстрактите инхибират значително репликацията на вирус херпес симплекс тип 1 (HSV-1) и тип 2 (HSV-2) в MDBK клетки, без видима цитотоксичност. Екстрактите показват силно антивирусно действие. 50% инхибиторни концентрации (IC₅₀) на от хлороформния *in vitro* екстракт (CS) са съответно 552 µg.mL⁻¹ и 487 µg.mL⁻¹. IC₅₀ на хлороформния *in vivo* екстракт (CES) са съответно 668 µg.mL⁻¹ и 780 µg.mL⁻¹. Вирусната репликация е потисната над 90%, когато и двата хлороформни екстракта са приложени при максимално поносими концентрации (МТС). Данните показват, че екстрактите, получени от диви растения, имат по-силен инхибиторен ефект, отколкото *in vitro* екстрактите. Хлороформният *in vivo* екстракт CES показва силен вирусоциден ефект. Екстрактът, приложен в МТС, инактивира извънклетъчния HSV-1 след 5 минути контакт над 90% (Δlog1.5).

6. Todorov, D., A. Hinkov, K. Shishkova, S. Shishkov. 2014. Antiviral potential of Bulgarian medicinal plants. *Phytochem. Rev.*, 13 (2): 525-538. DOI: 10.1007/s11101-014-9357-1, IF₂₀₁₄=2.894, SJR₂₀₁₄=0.923; Q1

Abstract: Medicinal plants have been widely used to treat a variety of infectious and non-infectious diseases. Bulgarian flora includes 4,300 plant species, over 500 of which are rare or endemic to the country or the Balkan region. The aim of the present work is to summarize comprehensively the investigations on the antiviral activity of Bulgarian medicinal plants from the past three decades. The effect of different extracts derived from *in vitro* propagated plants has been examined as well. The phytochemical composition and its influence on specific steps of the viral life cycle have been discussed in this paper. The review includes the following families: *Amaryllidaceae*, *Fabaceae*, *Geraniaceae*, *Lamiaceae*, *Onagraceae*, *Ranunculaceae*, *Rosaceae*, *Crophulariaceae* and *Rhodophyta*. Special attention has been paid to viruses as important human pathogens.

Резюме: Лечебните растения се използват широко за лечение на различни инфекциозни и неинфекциозни заболявания. Българската флора включва 4300 вида растения, над 500 от които са редки или ендемични за страната или Балканския регион. Целта на настоящата работа е изчерпателно да обобщи изследванията върху антивирусната активност на българските лечебни растения от последните три десетилетия. Ефектът на различни екстракти, получени от *in vitro* размножени растения, също е изследван. Фитохимичният състав и неговото влияние върху специфични етапи от жизнения цикъл на вируса са обсъдени в тази статия. Прегледът включва следните семейства: *Amaryllidaceae*, *Fabaceae*, *Geraniaceae*, *Lamiaceae*, *Onagraceae*, *Ranunculaceae*, *Rosaceae*, *Crophulariaceae* и *Rhodophyta*. Специално внимание е отделено на вирусите като важни човешки патогени.

7. Todorov, D., K. Shishkova, D. Dragolova, A. Hinkov, V. Kapchina-Toteva, S. Shishkov. 2015. Antiviral activity of medicinal plant *Nepeta nuda*. *Biotechnol. Biotechnol. Equipment*, 29 (Suppl. 1): 39-S43. DOI:10.1080/13102818.2015.1047215. IF₂₀₁₅=0.379, SJR₂₀₁₅=0.173; Q4.

Abstract: *Nepeta nudasubsp.nuda* L. is a valuable medicinal plant well-known for its various therapeutic properties. This study assessed the antiviral activity of four extracts derived by methanol and chloroform extractions from *in vivo* grown and *in vitro* propagated plants. The cytotoxicity was tested on MadinDarby bovine kidney (MDBK)

cell line. Maximal tolerated concentration (MTC) and cytotoxic concentration (CC₅₀) of both extracts were determined. Antiviral activity on viral replication was evaluated against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in MDBK cell line. The 50% inhibitory concentrations (IC₅₀) and selective index (SI) of the extracts against both viruses were calculated. The methanol extract, derived from the native plant exhibited the greatest antiviral activity. The IC₅₀ for both viruses was similar 320 mg/ml against HSV-1 and 510 mg/ml against HSV-2. The SI were 4.94 and 3.1, respectively. Applied in MTC, the extract inhibited viral replication by more than 95% in both HSV-1 and HSV-2. The virucidal effect was determined by the reduction of the infectious virus titer. All four extracts of *N. nuda* inactivated the extracellular form of HSV-2. The major virucidal activity was demonstrated by the chloroform extract from the native plant more than 99% viral inactivation. The extracts weakly affected the viral entry into the host cell. The highest inactivation was shown by the chloroform extract from the native plant more than 90%.

Резюме: *Nepeta nuda subsp. nuda* L. е медицинско растение, известно с различните си лечебни си свойства. В публикацията са представени резултатите от експериментите изследващи антивирусната активност на четири извлека, получени чрез екстракция с метанол и хлороформ на растения култивирани *in vivo* и *in vitro*. При определяне на токсичността беше използвана клетъчна линия Madin_Darby bovine kidney (MDBK). Беше определена максимално поносимата концентрация (MTC) и цитотоксична концентрация (CC₅₀) и на четирите екстракта. Беше изследвана активността на екстрактите спрямо репликацията на вирус Herpes simplex тип 1 (HSV-1) и тип 2 (HSV-2) в клетъчна линия MDBK. Беше определена инхибиторна концентрация 50% (IC₅₀) и селективният индекс (SI) на екстрактите срещу двата вирусни типа. Метаноловият екстракт, получен от нативното растение, показва най-висока активност. Стойностите за IC₅₀ за двата вирусни типа са близки - 320 mg/ml спрямо HSV-1 (SI=4,94) и 510 mg/ml спрямо HSV-2 (SI=3,1). Приложен в MTC, екстрактът инхибира вирусната репликация с повече от 95% както при HSV-1, така и при HSV-2. Вирусцидният ефект бе изследван чрез определяне на титъра на третираните извънклетъчните инфекциозни вириони. И четирите екстракта от *N. nuda* инактивират извънклетъчната форма на HSV-2. Най-силно инактивиращо действие показва хлороформният екстракт от нативното растение (повече от 99% вирусна инактивация). Екстрактите слабо повлияват навлизането на вируса в клетката гостоприемник като най активен при този тест отново беше хлороформният екстракт (повече от 90%).

8. Todorov, D., D. Pavlova, A. Hinkov, K. Shishkova, D. Dragolova, V. Kapchina-Toteva, S. Shishkov. 2015. Effect of *Teucrium chamaedrys* L. on Herpes simplex virus type 2. *Compt. rend. Acad. bulg. Sci.*, 68 (12): 1519-1526. IF₂₀₁₅= 0.233, SJR₂₀₁₅=0.205; Q3.

Abstract: *Teucrium chamaedrys* L. (Wall germander) is a widely distributed species of *Teucrium* (*Lamiaceae*) found in the spontaneous flora of Bulgaria, and some Central and South European countries as well. This is a medicinal plant with a history of traditional use in Bulgaria and in other Balkan countries for herbal tea and basic medical healing treatments. In our *in vitro* study, chloroform and methanol extracts received by soxhlet extraction as well as methanol extract obtained by thermostat extraction were tested for antiviral activity. Two of studied extracts inhibited the replication of Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) in MDBK cells significantly without apparent cytotoxicity. The 50% effective concentration (EC₅₀) of the chloroform extract was 350 µg/ml. The replication of the virus was suppressed over 82% from the extract applied in maximum tolerable

concentration (MTC). The methanol thermostat extract showed weak antiviral effect ($EC_{50} = 680 \mu\text{g/ml}$). The extracts applied in MTC inactivated extracellular virus, viral adsorption and entry of HSV-2. Antiherpes activity by crude extracts from *Teucrium chamaedrys* is observed for the first time.

Резюме: *Teucrium chamaedrys* L. (Wall germander) е широко разпространен вид *Teucrium* (*Lamiaceae*), срещащ се в естествената флора на България, както и в някои страни от Централна и Южна Европа. Това е лечебно растение с традиционна употреба в България и в други балкански страни за билкови чайове и основни медицински лечения. В нашето *in vitro* изследване хлороформен и метанолов екстракти, получени чрез екстракция по Соклет, както и метанолов екстракт, получен чрез екстракция чрез термостат, бяха тествани за антивирусна активност. Два от изследваните екстракти инхибират репликацията на Херпес симплекс вирус тип 2 (HSV-2) в MDBK клетки значително без видима цитотоксичност. 50% ефективна концентрация (EC_{50}) на хлороформния екстракт е $350 \mu\text{g/ml}$. Репликацията на вируса е потисната над 82% от екстракта, приложен в максимално допустима концентрация (MTC). Метаноловият термостатен екстракт показва слаб антивирусен ефект ($EC_{50} = 680 \mu\text{g/ml}$). Екстрактите, приложени в MTC, инактивират извънклетъчния вирус, вирусната адсорбция и навлизането на HSV-2. За първи път се наблюдава антихерпесна активност на сурови екстракти от *Teucrium chamaedrys*.

9. Angelova, P., A. Hinkov, V. Tsvetkov, K. Shishkova, D. Todorov, S. Shishkov. 2016. Inhibition of Human Herpes Virus Type 2 Replication by water Extract from *Nepeta nuda* L. *Acta Microbiologica Bulgarica*, 32 (2): 148-149. **SJR₂₀₂₁=0.14; Q4.**

Abstract: Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) causes recurrent, painful genital ulcers. In newborn infection is associated with significant morbidity and mortality. Prolonged treatment with commonly used nucleoside analogues leads to the selection of resistant strains. Compounds of natural origin is an area with great potential. Species of the genus *Nepeta* are widely used in folk medicine because of their antispasmodic, expectorant, diuretic, antiseptic, anti-cough, anti-asthmatic and febrifuge activities. We studied the antiviral activity of the extract water from *Nepeta nuda* L., derived from *in vivo* propagated plants. Maximum non-toxic concentration (MNC) was 4 mg/ml and 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) was 8 mg/ml. The extract significantly inhibited the replication of HSV-2 - IC_{50} was 0.75 mg/ml. Production of the virus yield is suppressed at 98%.

Резюме: Вирус Herpes simplex тип 2 (HSV-2) причинява рецидивиращи болезнени генитални язви. Инфекцията на новородени е свързана със висока заболеваемост и смъртност. Продължителното лечение най-често с нуклеозидни аналози води до селекция на резистентни вирусни щамове. Веществата с природен произход притежават голям лечебен потенциал. Растенията от род *Nepeta* се използват широко в народната медицина поради техните антиспазматични, отхрачващи, диуретични, антисептични, противокашлични, антиастматични и противовъспалителни свойства. Ние изследвахме антивирусната активност на воден екстракт, получен от нативно култивирано растение (*in vivo*) *Nepeta nuda* L. Беше определена максималната нетоксична концентрация (MNC) – 4 mg/ml и 50% цитотоксична концентрация (CC_{50}) – 8 mg/ml. Екстрактът инхибира значително репликацията на HSV-2 – 50% инхибиращата концентрация е 0.75 mg/ml. Продукцията на инфекциозното вирусно потомство се потиска до 98%.

10. Angelova, P., A. Hinkov, V. Tsvetkov, D. Todorov, K. Shishkova, D. Dragolova, S. Shishkov, V. Kapchina-Toteva. 2018. Antiherpes virus activity of extracts from *Artemisia chamaemelifolia* Vill. *Compt. rend. Acad. bulg. Sci.*, Vol 72, No11, pp.1475-1483. **IF₂₀₁₈=0.251; SJR₂₀₁₈=0.21; Q2.**

Abstract: Human alphaherpesvirus (HHV) type 2 is the causative agent of genital herpes. The inhibitory effect of water and chloroform soxhlet extracts from the aerial parts of Bulgarian plant *Artemisia chamaemelifolia* Vill. (*Asteraceae*) against the replication of HHV type 2 strain BA (sensitive to acyclovir) and strain DD (resistant to acyclovir) was investigated in vitro. Results from the antiviral experiments with water extract showed that it achieved protection of the cell monolayer ~70% (for both used strains) according to modified MTT test and inhibited production of infectious virus yield ~80% for strain BA and ~70% for strain DD according to yield reduction assay. The inhibition was dose-related. The water extract also exhibited weak virucidal activity in maximal nontoxic concentration. The chloroform soxhlet extract had no effect on the replication of the two strains used, nor did it affect the infectivity of extracellular virions.

Резюме: Human alphaherpesvirus (HHV) тип 2 е инфекциозен агент причиняващ генитален херпес. В публикацията са представени резултатите от изследването на ефекта на воден и хлороформен соксклетни екстракти, получени от надземните части на растението *Artemisia chamaemelifolia* Vill. (*Asteraceae*), спрямо репликацията на HHV тип 2 щам BA (чувствителен към Асусclovir) и щам DD (резистентен на Асусclovir). При антивирусните тестове водният екстракт постига ~ 70% протекция на клетъчният монослой (и за двата използвани щам) съгласно модифицираният МТТ тест и инхибира производството на инфекциозно вирусно потомство ~ 80% за щам BA и ~ 70% за щам DD. Ефектът е дозозависим. Водният екстракт проявява слаба вирусцидна активност приложен в максимална нетоксична концентрация. Хлороформеният соксклет екстракт не повлиява репликацията на двата използвани щам, както и инфекциозността на извънклетъчните вириони.

11. Hinkov A., Angelova P., Marchev A., Hodzhev Y., Tsvetkov V., Dragolova D., Todorov D., Shishkova K., Kapchina-Toteva V., Blundell R., Shishkov S., Georgiev. M., 2020. *Nepeta nuda* ssp. *nuda* L. water extract: Inhibition of replication of some strains of Human Alpha herpes virus (genus Simplex virus) in vitro, mode of action and NMR-based metabolomics, *Journal of Herbal Medicine* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2020.100334>. **IF₂₀₂₀=1.554, SJR₂₀₂₀=0.483; Q2.**

Abstract: *Nepeta nuda* L. has been used in traditional folk medicine for its diuretic, anti-asthmatic, antioxidant, spasmolytic, sedative and analgesic properties (attributed to the nepetalactones). In the present study, water extract from *Nepeta nuda* ssp. *nuda* L. was tested in order to study its' effect on the replication of Human Alpha herpes virus (HHV) type 1, strain F (ACV-sensitive) and type 2, strain DD (ACV-resistant) in vitro. Toxicity was measured at 48 h (CC₅₀ = 7.35 mg/ml±0.06) and 72 h (CC₅₀ = 4.488 mg/ml±0.308) after infection. The extract showed potent anti-herpesvirus activity in both antiviral tests performed (MTT-based colorimetric assay and yield reduction assay). By the time the extract was added, two experimental arrangements were applied. The antiviral activity increased when water extract was added simultaneously with the inoculation of the cell monolayer (EC₅₀ of 0.66 mg/ml±0.04 and 0.788 mg/ml±0.009 for the F and the DD strains, respectively, measured via colorimetric assay). The IC₅₀ value was 0.181 mg/ml±0.073 and 0.0888 mg/ml±0.014 for the F and the DD strains, respectively, measured via yield reduction assay.

Unfortunately, selectivity for viral versus cellular molecular targets (SI) was low except for the SI values (40.60 and 82.77 for the F and the DD strains, respectively) obtained via the yield reduction assay when water extract was added simultaneously with the inoculation of the cell monolayer. In both types of antiviral assays water extract retained activity against the ACV-resistant DD strain. The virucidal assay showed that water extract did not reduce the infectivity of either of the strains used at a concentration equal to the maximum non-toxic concentration. Therefore, the above-mentioned rise in the antiviral activity detected in experimental settings when the extract was added immediately after inoculation is not due to direct inactivation of the extracellular virions. Rather, it is due to interference with the adsorption but not the penetration (according to the results of the conducted experiment). The time of addition test demonstrated that the water extract continued to exhibit antiviral activity even when added 10 h after infection. All these observations suggest that water extract exhibits its anti-herpesvirus activity by influencing both early (adsorption) and late events of HHV replication. Metabolomic studies of the extract showed that the major phenolic acids present in the extract include rosmarinic, chlorogenic, gallic, vanillic, caffeic, protocatechuic, ferulic and cinnamic acids; while the presence of flavonoids was marked by cirsimaritin, chrysoeriol, vanillin, rutin and quercetin.

Резюме: *Nepeta nuda* L. се използва в традиционната народна медицина заради своите диуретични, антиастматични, антиоксидантни, спазмолитични, седативни и аналгетични свойства (приписвани на непеталактоните). В настоящото изследване водният екстракт от *Nepeta nuda ssp. nuda* L. беше тестван, за да се проучи ефектът му върху репликацията на човешки алфа херпесен вирус (HHV) тип 1, щам F (ACV-чувствителен) и тип 2, щам DD (ACV-резистентен) *in vitro*. Токсичността се измерва на 48 h ($CC_{50} = 7,35 \text{ mg/ml} \pm 0,06$) и 72 h ($CC_{50} = 4,488 \text{ mg/ml} \pm 0,308$) след инфекцията. Екстрактът показва мощна антихерпесвирусна активност и при двата проведени антивирусни теста (базиран на МТТ колориметричен анализ и анализ за намаляване на добива). По времето, когато екстрактът беше добавен, бяха приложени две експериментални подредби. Антивирусната активност се увеличава, когато водният екстракт се добавя едновременно с инокулацията на клетъчния монослой (EC_{50} от $0,66 \text{ mg/ml} \pm 0,04$ и $0,788 \text{ mg/ml} \pm 0,009$ съответно за щамове F и DD, измерени чрез колориметричен анализ). Стойността на IC_{50} е $0,181 \text{ mg/ml} \pm 0,073$ и $0,0888 \text{ mg/ml} \pm 0,014$ съответно за щамове F и DD, измерени чрез анализ за намаляване на добива. За съжаление, селективността за вирусни спрямо клетъчни молекулярни мишени (SI) беше ниска, с изключение на стойностите на SI (40,60 и 82,77 съответно за щамове F и DD), получени чрез анализа за намаляване на добива, когато водният екстракт беше добавен едновременно с инокулацията на клетъчен монослой. И при двата вида антивирусни анализи водният екстракт запазва активността срещу ACV-резистентния DD щам. Вируцидният анализ показва, че водният екстракт не намалява инфекциозността на нито един от щамове, използвани в концентрация, равна на максималната нетоксична концентрация. Следователно, гореспоменатото повишаване на антивирусната активност, открито в експериментални условия, когато екстрактът е добавен веднага след инокулацията, не се дължи на директно инактивиране на извънклетъчните вириони. По-скоро се дължи на въздействие на адсорбцията, но не и на проникването (според резултатите от проведения експеримент). Тестът за времето на добавяне показва, че водният екстракт продължава да проявява антивирусна активност дори когато се добави 10 часа след инфекцията. Всички тези наблюдения предполагат, че водният екстракт проявява своята антихерпесвирусна активност чрез повлияване както на ранните (адсорбция), така и на късните събития на репликацията на HHV. Метаболомните изследвания на екстракта показват, че основните фенолни

киселини, присъстващи в екстракта, включват розмаринова, хлорогенна, галова, ванилова, кафеена, протокатехуинова, ферулинова и канелена киселини; докато наличието на флавоноиди се свързва с цирсимаритин, хризоериол, ванилин, рутин и кверцетин.

12. Chuchkov K., R. Chayrov, A. Hinkov, D. Todorov, K. Shishkova, I. G. Stankova. 2020. Modifications on the heterocyclic base of ganciclovir, penciclovir, acyclovir - syntheses and antiviral properties, Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 39:7, 979-990. IF₂₀₂₀=1.381, SJR₂₀₂₀=0.27; Q3.

Abstract: Esters of the antiherpetic drugs ganciclovir, penciclovir with the bile acids (cholic, chenodeoxycholic and deoxycholic) and amino acid esters of acyclovir were generated and evaluated for their *in vitro* antiviral activity against herpes simplex viruses type 1 and type 2 (HSV-1, HSV-2). The antiviral assays demonstrated that modified analogs of ACV and PCV are less active compared to the initial substances against HSV-1 and HSV-2. CC₅₀ for ganciclovir-deoxycholate corresponded to the CC₅₀ of the other analogs and its activity is lower than ganciclovir. Obtained results show that tested modification do not improve bioavailability of nucleoside analogs in cells.

Резюме: Генерирани са естери на антихерпесните лекарства ганцикловир и пенцикловир с жлъчни киселини (холева, хенодеоксихолева и дезоксихолева) и аминокиселинни естери на ацикловир, като е определена тяхната *in vitro* антивирусна активност срещу вируси на херпес симплекс тип 1 и тип 2 (HSV-1, HSV-2). Антивирусните анализи показват, че модифицираните аналози на ACV и PCV са по-малко активни в сравнение с генеричните вещества срещу HSV-1 и HSV-2. CC₅₀ за ганцикловир-дезоксихолат съответства на CC₅₀ на другите аналози и неговата активност е по-ниска от ганцикловир. Получените резултати показват, че тестваната модификация не подобрява бионаличността на нуклеозидните аналози в клетките.

13. **Shishkova, K., I. Tsekov, R. Popov, S. Shishkov, and Z. Kalvatchev. 2022. Research of the Genetic Diversity of TT Viruses in Bulgaria. *Compt. rend. Acad. bulg. Sci.*, 75, 11, 1680–1686. IF₂₀₂₁=0.326; SJR₂₀₂₁=0.194; Q3.**

Abstract: Torque teno viruses (TTVs) are a member of the newly formed family Anelloviridae and contain single stranded circular DNA genome. It is believed that these viruses chronically infect people of any age, yet it is not clear what is their pathogenic potential. Our previous research has shown spread of TT viruses at least 61.87% in voluntary blood donors, 62.74% in patients with respiratory diseases, 65.21% in cases of hepatitis, 62.96% in unknown cases of pathology, 66.66% in patients with brain tumour and 64.28% in patients with renal transplantation. It was the first report demonstrating TT viruses in Bulgaria. The purpose of this work is identification of the main genotypes of TT viruses circulating in Bulgaria. The original viral DNA was isolated from blood samples from clinically healthy blood donors, a HBsAg positive sample and a patient with unexplained febrile condition. Phylogenetic tree analysis shows that most of our sequences are genetically related, highly correlated, and fall into a single cluster. The analysis shows that they are close relatives and most likely have a common ancestor. Part of the sequences could also be a separate cluster or the start of a new clone within that cluster, together with the reference sequences clustered by literature data in genotype 1.

Резюме: Вирусите Torque teno (TTV) са членове на новосформираното семейство Anelloviridae и съдържат едноверижен кръгъл ДНК геном. Смята се, че тези вируси хронично заразяват хора от всякаква възраст, но не е ясно какъв е техният патогенен потенциал. Нашите предишни изследвания показват разпространение на ТТ вируси не по-малко 61,87% при доброволни кръводарители, 62,74% при пациенти с респираторни заболявания, 65,21% при случаи на хепатит, 62,96% при неизвестни случаи на патология, 66,66% при пациенти с мозъчен тумор и 64,28% % при пациенти с бъбречна трансплантация. Това е първата статия, демонстрираща ТТ вируси в България. Целта на настоящата работа е идентифициране на основните генотипове на циркулиращите в България ТТ вируси. Оригиналната вирусна ДНК е изолирана от кръвни проби от клинично здрави кръводарители, HBsAg положителна проба и пациент с необяснимо фебрилно състояние. Анализът на филогенетичното дърво показва, че повечето от нашите последователности са генетично свързани, силно корелирани и попадат в един клъстер. Анализът показва, че те са близки роднини и най-вероятно имат общ прародител. Част от последователностите могат също да бъдат като отделен клъстер или да са началото на нов клон в рамките на този клъстер, заедно с референтните последователности, групирани по литературни данни в генотип 1.

14. Tsvetkov, V., A. Hinkov, D. Todorov, E. Benova, I. Tsonev, T. Bogdanov, S. Shishkov & K. Shishkova. 2020. Effect of Plasma-Activated Medium and Water on Replication and Extracellular Virions of Herpes Simplex Virus-1. *Plasma medicine*, 10, 1, 15-26. DOI: 10.1615/PlasmaMed.2020033626. SJR₂₀₂₀=0.228; Q3.

Abstract: We use a surface-wave sustained discharge (SWD) in argon at atmospheric pressure (using a plasma torch) in these experiments. The plasma torch is sustained using a 2.45-GHz electromagnetic wave with applied microwave powers of 13, 15, and 20 W. At these discharge conditions, the length of the plasma torch outside of the quartz tube is ~1–1.5 cm, and the gas plasma temperature does not exceed 40°C. This allows direct treatment of samples using the active zone of the discharge. In the cytotoxicity study, only two of the experimental settings achieve up to 50% survival of the cell monolayer after adding plasma-treated medium. Examining the effect of the plasma torch treatment media on herpes simplex virus-1 replication, we found that none of the applied experimental assays show significant protection on the cell monolayer. In a study of the virucidal action of a plasma-treated viral suspension diluted with sterile water at a ratio of 1:2 that was treated for 300 s at 13-W wave power, a decrease in the viral sample titer occurred unlike in the 1.67 log₁₀ control. Using optical emission spectroscopy, we found that OH intensity increases at the contact point between plasma and the water surface. Intensity of NO-γ also increases to the contact point with applied power. We also monitored the amount of peroxide radicals in plasma-treated water and nutrient medium in the presence of lucigenin.

Резюме: В тези експерименти използваме продължителен разряд на повърхностна вълна (SWD) в аргон при атмосферно налягане (с помощта на плазмена горелка). Плазмената горелка се поддържа с помощта на електромагнитна вълна с честота 2,45 GHz с приложени микровълнови мощности от 13, 15 и 20 W. При тези условия на разреждане дължината на плазмената горелка извън кварцовата тръба е ~1–1,5 cm, а температурата на газовата плазма не надвишава 40°C. Това позволява директно третиране на пробите с помощта на активната зона на разряда. В изследването за цитотоксичност само две от експерименталните настройки постигат до 50% оцеляване на клетъчния монослой след добавяне на третирана с плазма среда. Изследвайки ефекта на средата за третиране с плазмена горелка върху репликацията

на херпес симплекс вирус-1, открихме, че нито един от приложените експериментални анализи не показва значителна защита върху клетъчния монослой. При изследване на вируцидното действие на третирана с плазма вирусна суспензия, разредена със стерилна вода в съотношение 1:2, която е третирана в продължение на 300 s при мощност на вълната 13 W, се наблюдава намаляване на титъра на вирусната проба от 1,67 log₁₀ за разлика контролата. Използвайки оптична емисионна спектроскопия, открихме, че интензитетът на ОН се увеличава в точката на контакт между плазмата и водната повърхност. Интензитетът на NO-γ също се увеличава до контактната точка с приложена мощност. Ние също така наблюдавахме количеството пероксидни радикали в плазмено обработена вода и хранителна среда в присъствието на луцигенин.

15. Tsvetkov, V., D. Todorov, A. Hinkov, K. Shishkova, L. Velkova, A. Dolashki, P. Dolashka, S. Shishkov. 2021. Effect of extracts of some species from Phylum Mollusca against the replication of Human Alphaherpesviruses. Bulgarian Chemical Communications, 53, Special Issue-A, 66–72. IF₂₀₂₁=1.554, SJR₂₀₂₁=0.168; Q4.

Abstract: In the present study, hemolymph from *Rapana venosa* (hRv), *Helix lucorum* (Hl) and *Eriphia verrucosa* (hEv), mucus from *Helix aspersa* (Ha) and structural subunit α-HaH from hemocyanin of *H. aspersa* (sHa) were tested against replication of antiviral drugs acyclovir (ACV) sensitive strain F and BA of human alphaherpesvirus type 1 and type 2 *in vitro*. All six extracts showed no anti-herpesvirus activity using an MTT-based colorimetric assay to detect inhibition of Human Alphaherpesviruses (HHV) replication. In a virus analysis, the six extracts tested reduced the infectivity of both viruses from the two strains used to varying degrees and applied at maximum non-toxic concentrations. Fractions from hemolymph from *R. venosa* (MW 30-100 kDa) and from *E. verrucosa* (MW 3-100 kDa) showed the highest activity (over 99% inhibition of extracellular virions infectivity by first and second type of viruses respectively), sufficient to be considered pharmacologically significant. Hemolymph from *R. venosa* and *E. verrucosa* and mucus from *H. aspersa* have little effect on the adsorption of BA strain of human alpha herpesvirus type 2, and strain F of the HHV 1. The effect on the first type being more pronounced.

Резюме: В настоящото изследване са тествани хемолимфа от *Rapana venosa* (hRv), *Helix lucorum* (Hl) и *Eriphia verrucosa* (hEv), слуз от *Helix aspersa* (Ha) и структурна субединица α-HaH от хемоцианин от *H. aspersa* (sHa) спрямо репликация на чувствителни на антивирусното лекарство ацикловир (ACV) щамове F и BA на човешки алфахерпес вирус тип 1 и тип 2 *in vitro*. И шестте екстракта не показват антихерпесвирусна активност, използвайки базиран на МТТ колориметричен анализ за откриване на инхибиране на репликацията на човешки алфахерпесвируси (HHV). При вирусен анализ шестте тествани екстракта намаляват инфекциозността на двата вируса от двата използвани щам в различна степен и приложени в максимални нетоксични концентрации. Фракциите от хемолимфа от *R. venosa* (MW 30-100 kDa) и от *E. verrucosa* (MW 3-100 kDa) показват най-висока активност (над 99% инактивиране на инфекциозността на извънклетъчните вириони съответно от първи и втори тип вируси), достатъчна да се считат те за фармакологично значими. Хемолимфата от *R. venosa*, и *E. verrucosa* и слузта от *H. aspersa* имат малък ефект върху адсорбцията на BA щам на човешкия алфа херпесен вирус тип 2 и щам F на HHV 1. Ефектът върху първия тип е по-изразен.

16. Petrova, D., U. Gašić, L.Yocheva, A. Hinkov, Z. Yordanova, G. Chaneva, D. Mantovska, M. Paunov, L. Ivanova, M. Rogova, K. Shishkova, D.Todorov, A.Tosheva, V.

Kapchina-Toteva, V. Vassileva, A. Atanasov, D. Mišić, G. Bonchev and M. Zhiponova. 2022. Catmint (*Nepeta nuda* L.) Phylogenetics and Metabolic Responses in Variable Growth Conditions. *Front. Plant Sci.* 13:866777. doi: 10.3389/fpls.2022.866777. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.866777>. IF₂₀₂₁=6.627, SJR₂₀₂₁=1.359; Q1.

Abstract: *Nepeta nuda* (catmint; Lamiaceae) is a perennial medicinal plant with a wide geographic distribution in Europe and Asia. This study first characterized the taxonomic position of *N. nuda* using DNA barcoding technology. Since medicinal plants are rich in secondary metabolites contributing to their adaptive immune response, we explored the *N. nuda* metabolic adjustment operating under variable environments. Through comparative analysis of wild-grown and *in vitro* cultivated plants, we assessed the change in phenolic and iridoid compounds, and the associated immune activities. The wild-grown plants from different Bulgarian locations contained variable amounts of phenolic compounds manifested by a general increase in flowers, as compared to leaves, while a strong reduction was observed in the *in vitro* plants. A similar trend was noted for the antioxidant and anti-herpesvirus activity of the extracts. The antimicrobial potential, however, was very similar, regardless the growth conditions. Analysis of the *N. nuda* extracts led to identification of 63 compounds including phenolic acids and derivatives, flavonoids, and iridoids. Quantification of the content of 21 target compounds indicated their general reduction in the extracts from *in vitro* plants, and only the ferulic acid (FA) was specifically increased. Cultivation of *in vitro* plants under different light quality and intensity indicated that these variable light conditions altered the content of bioactive compounds, such as aesculin, FA, rosmarinic acid, cirsimaritin, naringenin, rutin, isoquercetin, epideoxyloganic acid, chlorogenic acid. Thus, this study generated novel information on the regulation of *N. nuda* productivity using light and other cultivation conditions, which could be exploited for biotechnological purposes.

Резюме: *Nepeta nuda* (котешка мента; *Lamiaceae*) е многогодишно лечебно растение с широко географско разпространение в Европа и Азия. Това изследване характеризира таксономичната позиция на *N. nuda*, използвайки технология за ДНК баркодиране за първи път. Тъй като лечебните растения са богати на вторични метаболити, допринасящи за техния адаптивен имунен отговор, ние изследвахме метаболитната корекция на *N. nuda*, действаща при променливи среди. Чрез сравнителен анализ на диво отглеждани и *in vitro* култивирани растения, ние оценихме промяната във фенолните и иридоидните съединения и свързаните с тях имунни дейности. Диворастящите растения от различни места в България съдържат различни количества фенолни съединения, проявяващи се с общо увеличение на цветовете в сравнение с листата, докато силно намаление се наблюдава при *in vitro* растенията. Подобна тенденция се наблюдава при антиоксидантната и антихерпесната активност на екстрактите. Антимикробният потенциал обаче е много подобен, независимо от условията на растеж. Анализът на екстрактите от *N. nuda* доведе до идентифицирането на 63 съединения, включително фенолни киселини и производни, флавоноиди и иридоиди. Количественото определяне на съдържанието на 21 целеви съединения показва тяхното общо намаление в екстрактите от *in vitro* растения и само феруловата киселина (FA) е увеличена. Култивирането на *in vitro* растения при различно качество и интензитет на светлина показва, че тези променливи светлинни условия променят съдържанието на биоактивни съединения, като ескулин, FA, розмаринова киселина, цирсимаритин, нарингенин, рутин, изокверцетин, епидезоксилоганова киселина, хлорогенова киселина. По този начин това проучване генерира нова информация за регулирането на продуктивността на *N. nuda* с помощта на светлина и други условия на култивиране, които могат да бъдат използвани за биотехнологични цели

17. Todorov, D., V. Tsvetkov, A. Hinkov, K. Shishkova, S. Shishkov, D. Pavlova, & D. Mantovska. 2022. Effect of the soil type over the antiherpes activities of *Teucrium chamaedrys*. Fresenius environmental bulletin, 31(9), 9831-9838. IF₂₀₂₁=0,61, SJR₂₀₂₁=0.182; Q4.

Abstract: Soil composition is one of the most important factors determining the metabolism of the plant life and from that - the amount of the active molecules - influencing the antiviral activity of the extracts. Our study tries to quantify its influence over the antiviral effect of the plant *Teucrium chamaedrys* L. over the human pathogen human alphaherpes virus. To get wider scope, our specimens have been collected from eastern Rhodope Mountain, Rila mountain and Sofia region - getting in our specter of research both mountain and lowland climate and serpentine, silicate and calcareous soils. The most active extracts are - the chloroform soxhlet extract from the region of Dobromirtzi village - inactivating extracellular virions of HHV-2 up to 99,57% and methanol thermostat one from the same region with more than 99,99% activity. The influence over viral replication cycle is weak, with most active extract have selective index just 1,87. As a result of the conducted experiments we suggest may influence the antiviral activity of *T. chamaedrys* populations in comparison to non-serpentine populations. This underlines the need to control the origin of the medicinal plants when used to test for antiviral activities.

Резюме: Съставът на почвата е един от най-важните фактори, определящи метаболизма на растенията и от това - количеството на активните молекули, влияещи върху антивирусната активност на екстрактите. Нашето проучване се опитва да определи количествено влиянието върху антивирусния ефект на растението *Teucrium chamaedrys* L. върху човешкия патоген - човешки алфахерпес вирус. За да получим по-широк обхват, нашите екземпляри са събрани от източните Родопи, Рила планина и Софийска област, попадайки в нашия спектър от изследвания както на планинския, така и на равнинния климат и серпентиновите, силикатни и варовити почви. Най-активните екстракти са хлороформният сокслетов екстракт от района на с. Добромирци, инактивиращ екстрацелуларните вириони на HHV-2 до 99,57% и метанолов термостат екстракт от същия район с над 99,99% активност. Влиянието върху цикъла на вирусна репликация е слабо, като повечето активни екстракти имат селективен индекс само 1,87. В резултат на проведените експерименти предполагаме, че почвата може да повлияе на антивирусната активност на популациите на *T. chamaedrys* в сравнение с не-серпентиновите популации. Това подчертава необходимостта от контрол на произхода на лечебните растения, когато се използват за тестване за антивирусни действия.

18. Hoxha, R.; Todorov, D.; Hinkov, A.; Shishkova, K.; Evstatieva, Y.; Nikolova, D. In Vitro Screening of Antiviral Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Fermented Foods. Microbiol. Res. 2023, 14, 333-342. <https://doi.org/10.3390/microbiolres14010026> IF₂₀₂₂=1.5, SJR₂₀₁₉=0.113, Q4.

Abstract: Studies of newly isolated strains of lactic acid bacteria (LAB) are a good basis for expanding the potential for their applications in functional foods, probiotic food supplements, and other probiotic products. They exhibit various functional properties, including such with antiviral activity. Probiotic strains can manifest their antiviral effects by various mechanisms, including direct interaction with viruses, production of antiviral compounds, or immune system modulation. Ten newly isolated LAB strains from traditional

fermented food products have been tested for the determination of their antiviral activity. This study was performed to evaluate the effect of cell-free supernatants (CFSs) from the studied strains for the effect on viral replication of Human alphaherpesvirus—HHV-1 and HHV-2 as well as for direct virucidal activity. The CFSs of the LAB strains were used in non-toxic concentrations of 25%, 6.25%, and 1.6%. No direct virucidal activity was observed in tested CFSs, but five of the strains observed a well-defined effect of viral replication inhibition with the selective index (SI) from 4.40 to >54. For two of these five strains, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* KZM 2-11-3 and *Lactiplantibacillus plantarum* KC 5-12 strong activity against HHV-2 with a selective index (SI) over 45 was detected, which is a good basis for further research.

Резюме: Изследванията на новоизолирани щамове на млечнокисели бактерии (ММК) са добра основа за разширяване на потенциала за приложението им във функционални храни, пробиотични хранителни добавки и други пробиотични продукти. Те проявяват различни функционални свойства, включително такива с антивирусна активност. Пробиотичните щамове могат да проявят своите антивирусни ефекти чрез различни механизми, включително директно взаимодействие с вируси, производство на антивирусни съединения или модулиране на имунната система. Десет новоизолирани LAB щама от традиционни ферментирани хранителни продукти са тествани за определяне на тяхната антивирусна активност. Това проучване е проведено, за да се оцени ефектът на безклетъчните супернатанти (CFSs) от изследваните щамове за ефекта върху вирусната репликация на човешките алфахерпесвируси - HHV-1 и HHV-2, както и за директната вируцидна активност. CFS на LAB щамовете са използвани в нетоксични концентрации от 25%, 6,25% и 1,6%. Не е наблюдавана пряка вируцидна активност при тествани CFS, но пет от щамовете наблюдават добре дефиниран ефект на инхибиране на вирусната репликация със селективен индекс (SI) от 4,40 до >54. За два от тези пет щама - *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* KZM 2-11-3 и *Lactiplantibacillus plantarum* KC 5-12 е установена силна активност срещу HHV-2 със селективен индекс (SI) над 45, което е добра основа за по-нататъшни изследвания.

19. Shkondrov, A., A. Hinkov, V. Cvetkov, K. Shishkova, D. Todorov, S. Shishkov, I. Stambolov, K. Yoncheva & I. Krasteva. 2023. *Astragalus glycyphyllos* L.: antiviral activity and tablet dosage formulation of a standardized dry extract. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 37, 1, 2221752, <https://doi.org/10.1080/13102818.2023.2221752>. IF₂₀₂₂=1,762, SJR₂₀₂₂=0.317; Q3.

Abstract: *Astragalus glycyphyllos* L. is widely used in Bulgarian folk medicine. Extracts from this plant have antiproliferative, antitumor and immune stimulating effects *in vitro* and *in vivo*. The aim of this study was to examine the potential antiviral activity of a standardized extract from the aerial parts of the plant and to formulate it in a suitable dosage form. A dry extract was obtained, and its phytochemical composition was determined by ultra-high-performance liquid chromatography– high resolution electrospray ionization mass spectrometry (UHPLC-HRESIMS). The extract contained flavonoids and predominantly saponins. 17(R),20(R)-3β,6α,16β-trihydroxycycloartanyl-23-carboxylic acid 16-lactone 3-O-β-D-glucopyranoside was used as a reference for quantitation. The extract had 3% saponins. The antiviral activity of the extract was tested against Simplexvirus human alpha type 1 (acyclovir sensitive) and 2 (acyclovir resistant) *in vitro*. Between 60% and 70% of protection was reached against both virus strains when the extract (at the maximal non-toxic concentration of 0.6 mg/mL) was added simultaneously with and 1 h after Madine and Darby

bovine kidney cell inoculation. The extract was also tested in combination with acyclovir only against Simplexvirus humanalpha type 1 *in vitro*. Further, the lyophilized extract was mixed with appropriate excipients aiming to prepare tablets via direct compaction. The optimized tablets fulfilled the requirements of the pharmacopoeia for disintegration and friability. Thus, the study demonstrated the possibility to formulate a standardized extract of *A. glycyphyllos* in tablets and their potential for adjuvant antiviral application in further trials.

Резюме: *Astragalus glycyphyllos* L. намира широко приложение в българската народна медицина. Екстрактите от това растение имат антипролиферативен, противотуморен и имуностимулиращ ефект *in vitro* и *in vivo*. Целта на това проучване е да се изследва потенциалната антивирусна активност на стандартизиран екстракт от надземните части на растението и да се формулира в подходяща дозирана форма. Беше получен сух екстракт и неговият фитохимичен състав беше определен чрез ултрависоко ефективна течна хроматография – електроспрей йонизираща масспектрометрия с висока разделителна способност (UHPLC-HRESIMS). Екстрактът съдържа флавоноиди и предимно сапонини. 17(R),20(R)-3 β ,6 α ,16 β -трихидроксициклоартанил-23-карбоксилова киселина 16-лактон 3-O- β -D-глюкопиранозид се използва като еталон за количествено определяне. Екстрактът съдържа 3% сапонини. Антивирусната активност на екстракта е тествана срещу Simplexvirus humanalpha тип 1 (чувствителен към ацикловир) и тип 2 (резистентен към ацикловир) *in vitro*. Между 60% и 70% защита беше постигната срещу двата вирусни щама, когато екстрактът (при максимална нетоксична концентрация от 0,6 mg/mL) беше добавен едновременно с и 1 час след инокулацията на говежди бъбречни клетки на Madine и Darby. Екстрактът също е тестван в комбинация с ацикловир само срещу Simplexvirus humanalpha тип 1 *in vitro*. Освен това, лиофилизираният екстракт се смесва с подходящи ексципиенти с цел получаване на таблетки чрез директно пресоване. Оптимизираните таблетки отговарят на изискванията на фармакопейта за разпад и ронливост. По този начин проучването демонстрира възможността за формулиране на стандартизиран екстракт от *A. glycyphyllos* в таблетки и техния потенциал за адювантно антивирусно приложение в по-нататъшни опити.

20. Shishkova, K., R. Gergova, E. Tasheva, S. Shishkov, I. Sirakov. 2023. Molecular Screening for High-Risk Human Papillomaviruses in Patients with Periodontitis. Viruses, 15, 809. <https://doi.org/10.3390/v15030809> IF2021 = 5,818 SJR2022=0,129, Q1.

Abstract: Members of the Papillomaviridae family account for 27.9–30% of all infectious agents associated with human cancer. The aim of our study was to investigate the presence of high-risk HPV (human papilloma virus) genotypes in patients with periodontitis and a pronounced clinical picture. To achieve this goal, after proving the bacterial etiology of periodontitis, the samples positive for bacteria were examined for the presence of HPV. The genotype of HPV is also determined in samples with the presence of the virus proven by PCR (polymerase chain reaction). All positive tests for bacteria associated with the development of periodontitis indicated the presence of HPV. There was a statistically significant difference in HPV positive results between the periodontitis positive target group and the control group. The higher presence of high-risk HPV genotypes in the target group, which was also positive for the presence of periodontitis-causing bacteria, has been proven. A statistically significant relationship was established between the presence of periodontitis-causing bacteria and high-risk strains of HPV. The most common HPV genotype that tests positive for bacteria associated with the development of periodontitis is HPV58.

Резюме: Членовете на семейство Papillomaviridae представляват 27,9–30% от всички инфекциозни агенти, свързани с рака при човека. Целта на нашето изследване беше

да се изследва наличието на високорискови HPV (човешки папиломен вирус) генотипове при пациенти с пародонтит и изразена клинична картина. За постигането на тази цел, след доказване на бактериалната етиология на пародонтита, положителните за бактерии проби бяха изследвани за наличие на HPV. Генотипът на HPV се определя и в проби с доказано чрез PCR (полимеразна верижна реакция) наличие на вируса. Всички положителни тестове за бактерии, свързани с развитието на пародонтит, показват наличие на HPV. Има статистически значима разлика в HPV положителните резултати между целевата група с положителен пародонтит и контролната група. Доказано е по-високото наличие на високорискови HPV генотипове в целевата група, която е положителна и за наличието на пародонтит-причиняващи бактерии. Установена е статистически значима връзка между наличието на бактерии, причиняващи пародонтит, и високорисковите щамове на HPV. Най-често срещаният HPV генотип, който дава положителен резултат за бактерии, свързани с развитието на пародонтит, е HPV58.

21. Shishkova, K., Stoymirska, A., Chayrov, R.; Shishkov, S., Sbirikova-Dimitrova, H., Rusew, R., Shivachev, B., Stankova, I. 2023. Amantadine and Rimantadine Analogues—Single-Crystal Analysis and Anti-Coronaviral Activity. Crystals, 13, 1374. <https://doi.org/10.3390/cryst13091374>. IF2022 = 2.67, SJR2022=0.458, Q2

Abstract. In this study, we utilized the human coronavirus 229E (HCoV-229E) for evaluating the *in vitro* efficacy of some analogues of the ion-channel inhibitors and Amantadine and Rimantadine. The application of these investigated compounds did not result in any detectable cytotoxic effects. Furthermore, we observed that the derivatives of both analogues did not affect the viability of MDBK cells. Amantadine and Rimantadine applied at a concentration of 50 µg/mL inhibited the replication by 47% and 36%, respectively. The derivatives of Amantadine displayed a slightly weaker inhibitory effect in comparison with its own inhibitory effect. The derivative **4R** of Rimantadine exhibited the same antiviral effect as the Rimantadine control, inhibiting viral replication by 37%. However, the other two derivatives of Rimantadine demonstrated lower activities. The molecular structures of the newly synthesized compounds were investigated thoroughly using single-crystal X-ray analysis. Molecular docking studies were performed using Autodock Vina. Two of the studied compounds **2A** and **4A** showed a promising binding affinity (-8.3 and -8.0 kcal/mol) towards SARS-CoV-2 RNA-dependent polymerase RNA site and SARS-CoV-2 Nsp3 (207-379, MES site) respectively.

Резюме. В това проучване използвахме човешкия коронавирус 229E (HCoV-229E) за оценка на *in vitro* ефикасността на някои аналози на инхибиторите на йонните канали и амантадин и римантадин. Третирането с тези изследваните съединения не е довело до никакви забележими цитотоксични ефекти. Освен това, ние наблюдавахме, че производните на двата аналога не повлияват жизнеспособността на MDBK клетките. Амантадин и Римантадин, приложени в концентрация от 50 µg/mL, инхибират репликацията съответно с 47% и 36%. Производните на амантадин показват малко по-слаб инхибиторен ефект в сравнение със собствения си инхибиторен ефект. Производното 4R на Римантадин показва същия антивирусен ефект като контролата на Римантадин, инхибирайки вирусната репликация с 37%. Другите две производни на римантадин обаче показват по-ниска активност. Молекулните структури на новосинтезираните съединения бяха изследвани щателно с помощта на монокристален рентгенов анализ. Проучванията за молекулярен докинг бяха извършени с помощта на Autodock Vina. Две от изследваните съединения 2A и 4A показаха обещаващ афинитет на свързване (-8,3 и -8,0 kcal/mol) към SARS-CoV-2

РНК-зависим полимеразен РНК сайт и SARS-CoV-2 Nsp3 (207-379, MES сайт)
съответно.