

РЕЗЮМЕТА НА НАУЧНИТЕ ТРУДОВЕТЕ И ПУБЛИКАЦИИТЕ

НА АС. Д-Р ИНЖ. ДОНИКА ГЕОРГИЕВА ИВАНОВА

ПРЕДСТАВЕНИ ЗА УЧАСТИЕ В КОНКУРС ЗА ЗАЕМАНЕ НА АКАДЕМИЧНА ДЛЪЖНОСТ **ДОЦЕНТ** В  
ОБЛАСТ НА ВИШЕТО ОБРАЗОВАНИЕ **4. ПРИРОДНИ НАУКИ, МАТЕМАТИКА И ИНФОРМАТИКА,**  
ПРОФЕСИОНАЛНО НАПРАВЛЕНИЕ **4.2. ХИМИЧЕСКИ НАУКИ, ПО НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ**  
**„БИООРГАНИЧНА ХИМИЯ, ХИМИЯ НА ПРИРОДНИТЕ И ФИЗИОЛОГИЧНО АКТИВНИТЕ ВЕЩЕСТВА“,**  
**КЪМ КАТЕДРА „ФАРМАКОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ НА ЖИВОТНИТЕ, БИОХИМИЯ И ХИМИЯ“,**  
**ВЕТЕРИНАРНОМЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ, ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ,**  
**ОБЯВЕН В ДВ БР.30/15.04.2022 Г.**

- ❖ Резюмета на научни публикации, в издания реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (Web of Science и Scopus), отнасящи се към **група от показатели В** от минималните национални и допърнителни изисквания към научната и преподавателската дейност на кандидатите за заемане на академична длъжност "доцент"

(публикации **извън** дисертационен труд за придобиване на ОНС "доктор")

**B1.** Zhelev Z., **D. Ivanova**, I.Aoki, T. Saga, and R. Bakalova. – 2-Deoxy-D-glucose sensitizes cancer cells to Barasertib and Everolimus by ROS-independent mechanism(s), *Anticancer Res.*, 2015, 35(12), 6623-6632, IF2015 = 1.895 (Q3), SJR = 0,829 (Q2).  
<https://ar.iiajournals.org/content/anticancer/35/12/6623.full.pdf>

Целта на настоящото изследване беше да се изследва: (i) възможността за повишаване на чувствителността на раковите клетки към противоракови лекарства, чрез използване на редокс модулятора 2-деокси-D-глюкоза (2-DDG); (ii) откриване на комбинации със синергично цитотоксичен ефект; (iii) изясняване ролята на реактивния кислород видове (ROS) за индукция на апоптоза и цитотоксичност при тези комбинации. Изследването обхваща 15 противоракови лекарства – както конвенционални, така и от ново поколение. Четири параметри бяха анализирани едновременно върху Jurkat клетъчна линия от левкемични лимфоцити, третиран с химеотерапевтици и 2-DDG (отделно или в комбинация): клетъчна жизнеспособност, индукция на апоптоза, нива на ROS и ниво на протеин-карбонилни продукти. Много добре изразен синергичен цитотоксичен ефект се установява след 48 часа третиране на Jurkat клетките с 2-DDG в комбинация с химеотерапевтиците: палбоциклиб, еверолимус, лонафарниб, бортезомиб и барасертиб. Показаният синергичен цитотоксичен ефект на еверолимус в комбинация с 2-DDG е придружен от много силна индукция на апоптоза в клетките, но много силно редуциране на нивото на ROS. Промени в нивата на протеин-карбонилни продукти не бяха установени. Синергичният цитотоксичен ефект на барасертиб с 2-DDG е придружен от много силна индукция на апоптоза в клетките, без никакво повишаване на нивата на ROS, но с повишаване на протеин-карбонилните продукти.

The aim of the present study was to investigate: (i) the possibility of sensitizing cancer cells to anticancer drugs using the redox modulator 2-deoxy-D-glucose (2-DDG); (ii) to find such combinations with synergistic cytotoxic effect; (iii) and to clarify the role of reactive oxygen species (ROS) for induction of apoptosis and cytotoxicity through these combinations. The study covers 15 anticancer drugs – both conventional and new-generation. Four parameters were analyzed simultaneously in Jurkat leukemia cells, treated by drugs or 2-DDG (separately or in combination): cell viability, induction of apoptosis, levels of ROS, and level of protein-carbonyl products. Very well-expressed synergistic cytotoxic effects were found after 48-h treatment of Jurkat cells with 2-DDG in combination with: palbociclib, everolimus, lonafarnib, bortezomib, and barasertib. The synergistic cytotoxic effect of everolimus with 2-DDG was accompanied by very strong induction of apoptosis in cells, but a very strong reduction of ROS level. Changes in the levels of protein-carbonyl products were not detected. The synergistic cytotoxic effect of barasertib with 2-DDG was accompanied by very strong induction of apoptosis in cells, without any increase of ROS levels, but with an enhancement of protein-carbonyl products.

**B2.** Zhelev Z., D. Ivanova, R. Bakalova, I. Aoki, and T. Saga. – Inhibition of pentose-phosphate pathway through 6-aminonicotinamide sensitizes leukemia lymphocytes, but not normal lymphocytes, to chemotherapeutics by ROS-independent mechanism, *Anticancer Res.*, 2016, 36(11), 6011-6020, IF2016 = 1.937 (Q3), SJR = 0,769 (Q2). doi:10.21873/anticancerres.11190 <https://ar.iijournals.org/content/anticancerres/36/11/6011.full.pdf>

Целта на настоящото изследване беше да се изследва: (i) възможността за сенсibiliзиране на левкемичните лимфоцити към противоракови лекарства чрез инхибиране на пентозо-фосфатния път чрез използването на 6-аминоникотинамид (6-ANA); (ii) да се намерят комбинации със синергичен цитотоксичен ефект върху левкемичните лимфоцити и да се изследва тяхната цитотоксичност върху нормалните лимфоцити; (iii) и да се изясни ролята на реактивните кислородни видове (ROS) в индукцията на апоптоза при тези комбинации. В проучването обхваща 15 противоракови лекарства – конвенционални и ново поколение. Експериментите са проведени върху левкемична Jurkat клетъчна линия и върху нормални лимфоцити, изолирани от клинично здрави кръводарители. Четири параметъра бяха анализирани едновременно в двете клетъчни суспензии, третирани от химиотерапевтици и 6-ANA (по отделно и в комбинации): клетъчна жизнеспособност, индукция на апоптоза, ниво на ROS и ниво на протеин-карбонилни продукти. Повечето комбинации от химиотерапевтик и 6-ANA се характеризират със синергичен цитотоксичен ефект върху Jurkat клетките. Синергичният ефект се увеличава с увеличаване на инкубационния период. При комбиниране на 6-ANA с конвенционални химиотерапевтици (например доксорубин), синергични цитотоксични ефекти са открити и при нормални лимфоцити. И при двата типа клетки цитотоксичността на комбинацията от доксорубин плюс 6-ANA се придружава от повишена индукция на апоптоза, но в слаба степен се намаляват нивата на ROS и протеин-карбонилни продукти, в сравнение с клетки, третирани с само доксорубин. При комбинация от 6-ANA с ново поколение противоракови лекарства (например еверолимус или барасертиб), синергичният цитотоксичен ефект върху левкемичните лимфоцити е също придружен от много силна индукция на апоптоза, но чрез ROS-независим механизъм(и). Нито една от тези комбинации не показват някаква цитотоксичност върху нормални лимфоцити. Данните предполагат, че 6-ANA може да се използва като допълнителен компонент в химиотерапията, което би позволило да се намалят терапевтични дози от противораковите лекарства, като по този начин да се свежде до минимум техните странични ефекти.

The aim of the present study was to investigate: (i) the possibility of sensitizing leukemia lymphocytes to anticancer drugs by inhibiting pentose-phosphate pathway using 6-aminonicotinamide (6-ANA); (ii) to find combinations with synergistic cytotoxic effect on leukemia lymphocytes and to investigate their cytotoxicity towards normal lymphocytes; (iii) and to clarify the role of reactive oxygen species (ROS) in the induction of apoptosis by those combinations. The study covers 15 anticancer drugs – conventional and newgeneration. The experiments were

performed on Jurkat leukemia cell line and normal lymphocytes, isolated from clinically healthy blood donors. Four parameters were analyzed simultaneously in both cell suspensions treated by drug or 6-ANA (separately, and in combination): cell viability, induction of apoptosis, level of ROS, and level of protein-carbonyl products. Most combinations of drug plus 6-ANA were characterized by synergistic cytotoxic effects on Jurkat cells. The synergism increased with increasing incubation time. Upon combination of 6-ANA with conventional chemotherapeutic (e.g. doxorubicin), synergistic cytotoxic effects were also detected in normal lymphocytes. In both cell types, the cytotoxicity of the combination of doxorubicin plus 6-ANA was accompanied by increased induction of apoptosis, but by a slight reduction of ROS and protein-carbonyl products compared to cells treated with doxorubicin only. Upon combination of 6-ANA with new-generation anticancer drugs (e.g. everolimus or barasertib), the synergistic cytotoxic effect on leukemia lymphocytes was also accompanied by very strong induction of apoptosis through ROS-independent mechanism(s). Neither of these combinations exhibited any cytotoxicity towards normal lymphocytes. The data suggest that 6-ANA could be used as a supplementary component in anticancer chemotherapy, and would allow therapeutic doses of anticancer drugs to be reduced, thereby minimizing their side-effects.

**B3.** Zhelev Z., D. Ivanova, D. Lazarova, I. Aoki, R. Bakalova, and T. Saga. – Docosahexaenoic acid sensitizes leukemia lymphocytes to barasertib and everolimus by ROS-dependent mechanism without affecting the level of ROS and viability of normal lymphocytes, *Anticancer Res.*, 2016, 36(4), 1673-1682, IF2016 = 1.937 (Q3), SJR = 0,769 (Q2). <https://ar.iiajournals.org/content/anticancer/36/4/1673.full.pdf>

Целта на настоящото проучване е: (i) да се изследва възможността за сензибилизирание на левкемични лимфоцити спрямо противоракови лекарства, с използване на докозахексаенова киселина (DHA); (ii) да се намерят комбинации със синергичен цитотоксичен ефект върху левкемични лимфоцити, без или с много ниска цитотоксичност спрямо нормалните лимфоцити; (iii) и да се изясни ролята на активните форми на кислорода (ROS) за индукция на апоптоза и цитотоксичност чрез приложение на такива комбинации. Изследвани са 15 противотуморни препарати – конвенционални и ново поколение. Добре изразен синергичен цитотоксичен ефект се наблюдава след третиране на левкемични лимфоцити (Jurkat) с DHA в комбинация с: Баразертиб, Лонафарниб, Еверолимус и Палбоциклиб. Подбрани са две комбинации, DHA с еверолимус или барасертиб и е изследван техният ефект върху жизнеспособността на нормалните лимфоцити, както и върху производството на ROS и индукцията на апоптоза в двете клетъчни линии (левкемични и нормални лимфоцити). При избраните концентрации DHA, еверолимус и барасертиб (прилагани поотделно) са цитотоксични към левкемични лимфоцити, но не и към нормалните такива. В левкемичните лимфоцити цитотоксичността на комбинациите препарати е съпроводена от силна индукция на апоптоза и производство на ROS. В нормалните лимфоцити приложените препарати – самостоятелно и в комбинация с DHA, не повлияват нивото на ROS и не предизвикват апоптоза. Доколкото е известно, настоящото проучване е първото, което изследва синергична ROS-зависима цитотоксичност между DHA и противотуморни препарати от ново поколение, като еверолимус и барасертиб. Тези комбинации не предизвикват производство на ROS във високи концентрации в нормалните (неракови) клетки. Данните предполагат, че DHA може да се използва като допълнителен компонент в противораковата химиотерапия, позволявайки намаляване на терапевтичните дози на химиотерапевтика (еверолимус и барасертиб), което ще доведе до намаляване на страничните ефекти.

The aim of the present study was: (i) to investigate the possibility of sensitizing leukemia lymphocytes to anticancer drugs using docosahexaenoic acid (DHA); (ii) to find combinations with synergistic cytotoxic effect on leukemia lymphocytes, without or with only very low cytotoxicity towards normal lymphocytes; (iii) and to clarify the role of reactive oxygen species (ROS) in the induction of apoptosis and cytotoxicity by such combinations. The study covered 15 anticancer drugs, conventional and new-generation. Well-expressed synergistic cytotoxic effects were observed after treatment of leukemia lymphocytes (Jurkat) with DHA in combination with: barasertib, lonafarnib, everolimus, and palbociclib. We selected two synergistic combinations, DHA with everolimus or

barasertib, and investigated their effects on viability of normal lymphocytes, as well as on the production of ROS and induction of apoptosis in both cell lines (leukemia and normal). At the selected concentrations, DHA, everolimus and barasertib (applied separately) were cytotoxic towards leukemia lymphocytes, but not normal lymphocytes. In leukemia cells, the cytotoxicity of combinations was accompanied by strong induction of apoptosis and production of ROS. In normal lymphocytes, drugs alone and in combination with DHA did not affect the level of ROS and did not induce apoptosis. To our knowledge, the present study is the first to report synergistic ROS-dependent cytotoxicity between DHA and new-generation anticancer drugs, such as everolimus and barasertib, that is cancer cell-specific (particularly for acute lymphoblastic leukemia cells Jurkat). These combinations are harmless to normal lymphocytes and do not induce abnormal production of ROS in these cells. The data suggest that DHA could be used as a supplementary component in anticancer chemotherapy, allowing therapeutic doses of everolimus and barasertib to be reduced, minimizing their side-effects.

**B4.** Zhelev Z., D. Ivanova, R. Bakalova, I. Aoki, and T. Higashi. – Synergistic cytotoxicity of melatonin and new-generation anticancer drugs against leukemia lymphocytes, but not normal lymphocytes, *Anticancer Res.*, 2017, 37(1), 149-159, IF2017 = 1.865 (Q4), SJR = 0,717 (Q2). doi:10.21873/anticancerres.11300; <https://ar.iiarjournals.org/content/anticancerres/37/1/149.full.pdf>

Настоящото проучване демонстрира специфична чувствителност на левкемични лимфоцити към противоракови лекарствени средства, чрез използването на мелатонин и изяснява ролята на реактивните кислородни видове (ROS) при индуцирането на апоптоза. Проучването обхваща четири конвенционални и 11 противоракови лекарствени средства от ново поколение. Четири параметрите са анализирани едновременно върху левкемични и нормални лимфоцити, третирани с химиотерапевтици, мелатонин или техни комбинации: клетъчна жизнеспособност, индукция на апоптоза, ниво на реактивни кислородни видове (ROS) и ниво на протеин-карбонил продукти. Почти всички изследвани комбинации между мелатонин и химиотерапевтици от ново поколение се характеризираха с индуциране на синергична цитотоксичност по отношение на левкемични лимфоцити, докато при комбинациите с конвенционални лекарствени средства се наблюдаваха адитивен или антагонистичен ефект върху клетъчната жизнеспособност. Адитивната цитотоксичност при левкемични лимфоцити, след прилагане на доксорубин в комбинация с мелатонин, беше придружена от редуциране нивата на ROS и протеин-карбонилни продукти, както и чрез потискане на процеса на апоптозата. В нормални лимфоцити се установява, че няма значителна промяна в нито един от изследваните параметри, в сравнение с клетки, третирани само с доксорубин. Комбинациите от еверолимус плюс мелатонин и барасертиб плюс мелатонинът показват впечатляващ синергичен цитотоксичен ефект върху левкемични лимфоцити, но не повлияват жизнеспособността на нормални лимфоцити. При левкемичните лимфоцити синергичната цитотоксичност е придружена от силна индукция на апоптоза, но се наблюдава редуциране на нивата на ROS до ниво под това на контролата. В нормални лимфоцити, тези комбинации не променят нивата на ROS, както и на протеин-карбонилни продукти и не предизвикват апоптоза. Данните показват, че мелатонин е обещаващ допълнителен компонент в химиотерапията, който позволява намаляване на терапевтичните дози на противораковите лекарствени средства, свеждайки до минимум техните странични ефекти.

The present study demonstrates specific sensitization of leukemia lymphocytes towards anticancer drugs using melatonin and clarifies the role of reactive oxygen species (ROS) for induction of apoptosis. The study covers four conventional and 11 new-generation anticancer drugs. Four parameters were analyzed simultaneously in leukemia and normal lymphocytes treated with drug, melatonin, or their combination: cell viability, induction of apoptosis, level of reactive oxygen species (ROS), and level of protein-carbonyl products. Almost all investigated combinations of melatonin with new-generation anticancer drugs were characterized by synergistic cytotoxicity towards leukemia lymphocytes, while the combinations with conventional drugs exhibited additive or antagonistic effects on cell viability. In leukemia lymphocytes, the additive cytotoxicity of doxorubicin plus melatonin was accompanied by low levels of ROS and protein-carbonyl products, as well as by suppression of apoptosis. In normal lymphocytes, none of the studied parameters changed significantly compared to cells treated with doxorubicin only. The combinations

of everolimus plus melatonin and barasertib plus melatonin exhibited impressive synergistic cytotoxic effects on leukemia lymphocytes but did not affect the viability of normal lymphocytes. In leukemia cells, the synergistic cytotoxicity was accompanied by strong induction of apoptosis but a decrease of ROS to a level below that of the control. In normal lymphocytes, these combinations did not affect the level of ROS nor of protein-carbonyl products, and did not induce apoptosis. The data suggest that melatonin is a promising supplementary component in chemotherapy which allows the therapeutic doses of anticancer drugs to be reduced, minimizing their side-effects.

**B5. Ivanova D., Z. Zhelev, D. Lazarova, P. Getsov, R. Bakalova and I. Aoki. - Vitamins C and K3: a powerful redox system for sensitizing leukemia lymphocytes to everolimus and barasertib, Anticancer Res., 2018, 38(3), 1407-1414, IF2018 = 1.935 (Q4), SJR = 0,722 (Q2); doi:10.21873/anticancerres.12364; <https://ar.iijournals.org/content/anticancerres/38/3/1407.full.pdf>**

Цел: Последните проучвания предоставят убедителни доказателства, че комбинираното приложение на витамин С и провитамин К3 (менадион) има противоракова активност. Молекулярните механизми в основата на този процес все още не са добре изучени. Настоящото проучване има за цел да изследва ефекта на комбинацията от витамин С и провитамин К3 върху редокс-статуса на левкемични и нормални лимфоцити, както и техният сенсibiliзиращ ефект спрямо различни противоракови лекарства.

Материали и методи: Цитотоксичността на веществата се регистрира с оцветяване с трипаново синьо (багрилото прониква през клетъчната мембрана на мъртвите клетки) и измерване с автоматичен брояч на клетки. Апоптозата се анализира чрез флуоресцеин изотиоцианат-анексин V тест. Оксидативният стрес се детектира чрез определяне на вътреклетъчните нива на активни форми на кислорода и азота.

Резултати: Комбинираното приложение на 300  $\mu\text{M}$  витамин С и 3  $\mu\text{M}$  провитамин К3 намалява жизнеспособността на левкемичните лимфоцити с  $\sim 20\%$ , но не влияе върху жизнеспособността на нормалните лимфоцити. Всички комбинации от противотуморен препарат плюс витамини С и К3 се характеризират със синергичен цитотоксичен ефект на клетки Jurkat, в сравнение с клетки (от същата клетъчна линия), третирани само с лекарство за 24 часа. В случая на барасертиб и еверолимус този синергичен ефект се увеличава в рамките на 72 часа. Това е придружено и от силна индукция на апоптоза, намаляване на нивото на хидропероксиди и умерено повишено съдържание на протеин-карбонилни продукти в левкемичните лимфоцити.

Заклучение: Левкемичните лимфоцити са по-чувствителни на противотуморни препарати (еверолимус или барасертиб) при комбинирано приложение с витамини С и К3, в сравнение с нормалните лимфоцити. Комбинацията от витамин С и К3, с цел модулиране на редокс-хомеостазата, има перспектива да се прилага заедно с конвенционалната химиотерапия за допълнително сенсibiliзиране на левкемичните лимфоцити към лекарствените препарати.

Background/Aim: Recent studies provided convincing evidence for the anticancer activity of combined application of vitamin C and pro-vitamin K3 (menadione). The molecular pathways underlying this process are still not well established. The present study aimed to investigate the effect of the combination of vitamin C plus pro-vitamin K3 on the redox status of leukemia and normal lymphocytes, as well as their sensitizing effect for a variety of anticancer drugs. Materials and Methods: Cytotoxicity of the substances was analyzed by trypan blue staining and automated counting of live and dead cells. Apoptosis was analyzed by fluorescein isothiocyanate-annexin V test. Oxidative stress was evaluated by the intracellular levels of reactive oxygen and nitrogen species and protein-carbonyl products. Results: Combined administration of 300  $\mu\text{M}$  vitamin C plus 3  $\mu\text{M}$  pro-vitamin K3 reduced the viability of leukemia lymphocytes by  $\sim 20\%$ , but did not influence the viability of normal lymphocytes. All combinations of anticancer drug plus vitamins C and K3 were characterized by synergistic cytotoxicity towards Jurkat cells, compared to cells treated with drug alone for 24 h. In the case of barasertib and everolimus, this synergistic cytotoxicity increased within 72 hours. It was accompanied by strong induction of apoptosis, but a reduction of level of hydroperoxides and

moderately increased protein-carbonyl products in leukemia cells. Conclusion: Leukemia lymphocytes were more sensitive to combined administration of anticancer drug (everolimus or barasertib) plus vitamins C and K3, compared to normal lymphocytes. The combination of vitamin C plus K3 seems to be a powerful redox system that could specifically influence redox homeostasis of leukemia cells and sensitize them to conventional chemotherapy.

**B6. Ivanova D., Z. Zhelev, S. Semkova, I. Aoki, R. Bakalova.** - Resveratrol modulates the redox-status and cytotoxicity of anticancer drugs by sensitizing leukemic lymphocytes and protecting normal lymphocytes, *Anticancer Res.*, 2019, 39(7), 3745-3755, IF2019 = 1.994 (Q4), SJR = 0,716 (Q2); doi:10.21873/anticancerres.13523; <https://ar.iijournals.org/content/anticancerres/39/7/3745.full.pdf>

Цел: Изследването е насочено към ефекта на ресвератрол върху редокс-статуса и жизнеспособността на левкемични и нормални лимфоцити, както и към способността му да повишава чувствителността на левкемични лимфоцити към химеотерапевтици.

Материали и методи: Определянето на цитотоксичността се извършва чрез оцветяване с трипаново синьо, индукцията на апоптоза – чрез тест за експресия на Анексин V, и оксидативен стрес – чрез определяне вътреклетъчните нива на реактивни кислородни видове (ROS) и протеин-карбонил продукти.

Резултати: Инкубирането на ресвератрол в комбинация с повечето от изследваните противоракови лекарства е довело до по-високи токсичност, отколкото ресвератрол или химеотерапевтика приложени самостоятелно. При третиране на левкемия лимфоцити с барасертиб и еверолимус, в присъствие на ресвератрол, се наблюдава синергичен цитотоксичен ефект придружен от силна индукция на апоптоза, повишаване на нивата на хидропероксиди и незначителни промени в протеин-карбонилните продукти. Не се наблюдават промени в тези параметри при нормалните лимфоцити.

Заклучение: Ресвератрол е обещаващ допълнителен елемент към противораковата терапия, който може да позволи намаляване на терапевтичните дози на химеотерапевтиците барасертиб и еверолимус, свеждайки до минимум техните странични ефекти.

Background/Aim: The study is directed to the effect of resveratrol on the redox-status and viability of leukemic and normal lymphocytes, as well as its ability to sensitize leukemic lymphocytes to anticancer drugs.

Materials and Methods: Cytotoxicity was analyzed by trypan blue staining, apoptosis – by Annexin V test, and oxidative stress – by the intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) and protein-carbonyl products.

Results: Incubation of resveratrol in combination with the majority of anticancer drugs resulted in higher toxicity than resveratrol or drug alone. In the case of leukemic lymphocytes treated with barasertib and everolimus in the presence of resveratrol, synergistic cytotoxicity was accompanied by strong induction of apoptosis, increased levels of hydroperoxides and insignificant changes in protein-carbonyl products. None of these parameters changed in normal lymphocytes.

Conclusion: Resveratrol is a promising supplementary compound for anticancer therapy, that may allow reduction of the therapeutic doses of barasertib and everolimus, minimizing their side-effects.

**B7. Ivanova D., Z. Zhelev, G. Zlateva, D. Lazarova, Z. Yaneva, R. Panovska, I. Aoki, R. Bakalova.** – Effect of alpha-tocopheryl succinate on the cytotoxicity of anticancer drugs towards leukemia lymphocytes, *Anticancer Res.*, 2022, 42(1), 547 – 554, IF2020 = 2.480 (Q4), SJR = 0,735 (Q2); <https://doi.org/10.21873/anticancerres.15512>.

Цел: Това проучване анализира ефекта на  $\alpha$ -токоферил сукцинат ( $\alpha$ -TS) върху редокс-състоянието на левкемични и нормални лимфоцити, както и тяхната чувствителност към петнадесет противоракови лекарствени средства.

Материали и методи: Жизнеспособността на клетките беше анализирана чрез автоматизирано преброяване на живи и мъртви клетки и метода за оцветяване с трипаново синьо. Апоптозата се анализира чрез FITC-Annexin V тест. Оксидативният стрес се оценява чрез измерване на вътреклетъчните нива на реактивни кислородни видове (ROS) и протеин-карбонилни продукти.

Резултати: повечето от комбинациите ( $\alpha$ -TS плюс химеотерапевтик) проявяват адитивен или антагонистичен ефект върху пролифериращата способност и жизнеспособността на левкемични лимфоцити.  $\alpha$ -TS в комбинация с барасертиб, бортезомиб или лонафарниб показват силно изразена синергична цитотоксичност, която е най-добре изразена при случая с барасертиб. Този ефект беше придружен с впечатляваща индукция на апоптоза, както и с повишено образуване на ROS, но с незначителни промени в нивата на протеин-карбонилни продукти. Комбинацията от  $\alpha$ -TS плюс барасертиб не променя жизнеспособността на нормални лимфоцити и не предизвиква оксидативен стрес и апоптоза в тези клетки.

Заклучение:  $\alpha$ -TS може да бъде обещаващ адювант в противораковата терапия, след първоначалното лечение на злокачественото заболяване, особено при остра лимфобластна левкемия, тъй като спомага за намаляване на терапевтичните дози на барасертиб, бортезомиб и лонафарниб, увеличавайки техната ефективност и минимизиране на техните странични ефекти.

Background/Aim: This study analysed the effect of  $\alpha$ -tocopheryl succinate ( $\alpha$ -TS) on the redox-state of leukemia and normal lymphocytes, as well as their sensitization to fifteen anticancer drugs.

Materials and Methods: Cell viability was analyzed by trypan blue staining and automated counting of live and dead cells. Apoptosis was analyzed by FITC-Annexin V test. Oxidative stress was evaluated by the intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) and protein-carbonyl products.

Results: Most combinations ( $\alpha$ -TS plus anticancer drug) exerted additive or antagonistic effects on the proliferation and viability of leukemia lymphocytes.  $\alpha$ -TS combined with barasertib, bortezomib or lonafarnib showed a strong synergistic cytotoxic effect, which was best expressed in the case of barasertib. It was accompanied by impressive induction of apoptosis and increased production of ROS, but insignificant changes in protein-carbonyl levels.  $\alpha$ -TS plus barasertib did not alter the viability and did not induce oxidative stress and apoptosis in normal lymphocytes.

Conclusion:  $\alpha$ -TS could be a promising adjuvant in second-line anticancer therapy, particularly in acute lymphoblastic leukemia, to reduce the therapeutic doses of barasertib, bortezomib, and lonafarnib, increasing their effectiveness and minimizing their side effects.

**B8. Ivanova D., Z. Yaneva, R. Bakalova, S. Semkova and Zh. Zhelev.** -The antimalaria drug artemisinin displays strong cytotoxic effect on leukaemia lymphocytes in combination with vitamin C and pro-vitamin K3. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, 2021, 24(4), 533 – 543, SJR2020 = 0,211 (Q3); DOI: 10.15547/bjvm.2019-0134; <http://www.uni-sz.bg/bjvm/BJVM%20December%202021%20p.533-543.pdf>.

Това проучване изследва противораковия ефект на противопаразитното лекарствено средство артемизинин, в комбинация с два редокс модулятора: витамин С и провитамин К3 (С/К3) Експериментите са проведени върху левкемични лимфоцити, Jurkat клетъчна линия. Клетките бяха третирани с артемизинин, или с витамините С/К3 самостоятелно, както и в комбинации от трите съединения. Клетъчната пролиферация и жизнеспособност бяха анализирани чрез метода на трипаново синьо и автоматично преброяване на клетките. Резултатите показват, че артемизинин (>10  $\mu$ M) потиска клетъчната пролиферация, но не предизвиква клетъчна смърт до концентрация 500  $\mu$ M. Противопаразитното лекарствено средство демонстрира ясно изразен цитостатичен ефект при концентрации в диапазона от 250  $\mu$ M – 500  $\mu$ M – клетките не се размножават,

но са все още живи. Комбинацията от витамините С/К3 (200:2, 300:3  $\mu\text{M}$  /  $\mu\text{M}$ ), приложени самостоятелно, не повлияват клетъчната пролиферация и жизнеспособност. Витамините С/К3 в концентрационно съотношение 500:5 ( $\mu\text{M}$ /  $\mu\text{M}$ ) намаляват активността на клетъчната пролиферация с  $\sim 10\%$ . Тройната комбинация от артемизинин/ витамин С/провитамин К3 проявява синергични антипролиферативни ефекти при всички анализирани концентрационни съотношения. Този синергичен ефект се усилва с повишаване на концентрацията на витамините С/К3. Въз основа на литературни данни се предполага, че антипролиферативният ефект на тройната комбинация е медиран от промени в редокс-хомеостаза на раковите клетки. Редокс системата С/К3 вероятно действа върху митохондриалната активност на раковите клетки и повишава производството на супероксид анион радикал, както и активира проапоптотични сигнални пътища, специфични за раковите клетки. Но от друга страна, артемизинин може да доведе до образуване на хидроксилни радикали в резултат на активиране на реакциите на Фентън, както и изчерпване на вътреклетъчните редуциращи еквиваленти. Комбинацията от двата редокс механизма водят до активиране на сигнални пътища за индуциране на смърт при ракови клетки.

This study investigated the anticancer effect of the anti-parasitic drug artemisinin in combination with two redox modulators: vitamin C and pro-vitamin K3 (C/K3) The experiments were conducted on leukaemia cells Jurkat. Cells were treated with either artemisinin or C/K3 alone and with all three compounds. Cell proliferation and viability were analysed using trypan blue staining and automated cell counting. The results showed that artemisinin ( $>10 \mu\text{M}$ ) suppressed cell proliferation activity, but did not induce cell death up to  $500 \mu\text{M}$ . The drug demonstrated a clear cytostatic effect at concentrations  $250 \mu\text{M}$ - $500 \mu\text{M}$  – Jurkat cells did not proliferate, but were alive. The combination C/K3 (200:2, 300:3  $\mu\text{M}$  /  $\mu\text{M}$ ) applied alone did not affect cell proliferation and viability. Vitamins C/K3 in concentration ratio 500:5 ( $\mu\text{M}$ /  $\mu\text{M}$ ) decreased cell proliferation activity by  $\sim 10\%$ . The triple combination artemisinin/C/K3 manifested synergistic anti-proliferative effects at all concentration ratios analysed. This synergistic effect increased with increasing C/K3 concentration. Based on literature data, it was assumed that the anti-proliferative effect of the triple combination was mediated by changes in the redox-homeostasis of cancer cells. The C/K3 redox system likely acted on cancer mitochondria and increased superoxide production and activation of pro-apoptotic signals, specific for cancer cells. On the other hand, artemisinin could generate hydroxyl radicals as a result of activation of Fenton reactions, depleting intracellular reducing equivalents. Both redox mechanisms lead to activation of signal pathways for induction of cancer cell death.

**B9.** Bakalova R., E. Georgieva, D. Ivanova, Z. Zhelev, I. Aoki, and T. Saga. – Magnetic resonance imaging of mitochondrial dysfunction and metabolic activity, accompanied by overproduction of superoxide, ACS Chem. Neurosci., 2015, 6(12), 1922-1929, IF2015 = 4.096 (Q1), SJR = 1,819 (Q1); DOI: 10.1021/acchemneuro.5b00220.

Това проучване показва, че проникваща в митохондриите нитроксидна сонда (mito-TEMPO) позволява откриване на супероксид анион радикал и визуализиране на митохондриална дисфункция в живите клетки поради ефекта на скъсяването на T1 в ЯМР. Митохондриалната дисфункция се индуцира чрез третиране на клетки с ротенон и 2-метоксиестрадиол (2-ME/Rot). Измерванията с ЯМР бяха извършени на 7T MRI. Клетките, третирани с 2-ME/Rot, се характеризират със свръхпроизводство на супероксид анион радикал, което се потвърждава чрез конвенционален аналитичен тест за детекция на супероксид, дихидроетидиум (DHE) тест. В присъствието на mito-TEMPO, интензитетът на ЯМР сигнала в 2-ME/Rot-третирани клетки е  $\sim 30\text{-}40\%$  по-висок в сравнение с този в нетретирани клетки или само в хранителна среда. В моделни (безклетъчни) системи наблюдавахме, че супероксид анион радикала, но не и водороден пероксид, повишава интензивността на T1-измерения ЯМР сигнал на mito-TEMPO. Освен това, супероксид анион радикала възстановява T1- измерения ЯМР контраст на mito-TEMPO, неконтрастен (диамагнитен) аналог на mito-TEMPO. Това беше потвърдено и с помощта на ЕПР спектроскопия. Резултатите показват, че супероксидният радикал участва в засилването на T1- измерения ЯМР контраст в живите клетки, в отсъствието и в



присъствието на мито-ТЕМПО. Този доклад дава насока за откриване на нови възможности за функционален ЯМР, за откриване на метаболитна активност, придружена от свръхпроизводство на супероксид анион радикал, както и от нарушаване на баланса между супероксид и водороден пероксид, много важен подход за изясняване на фините молекулярни механизми в регулиране на много патологии. Визуализацията на митохондриалната активност в реално време може да бъде от решаващо значение за изясняване на молекулярният механизъм на функционалния ЯМР в неговата общоприета дефиниция, като метод за откриване на невровакуларно свързване.

This study shows that a mitochondria-penetrating nitroxide probe (mito-TEMPO) allows detection of superoxide and visualization of mitochondrial dysfunction in living cells due to the effect of T1 shortening in MRI. Mitochondrial dysfunction was induced by treatment of cells with rotenone and 2-methoxyestradiol (2-ME/Rot). The MRI measurements were performed on 7T MRI. The 2-ME/Rot-treated cells were characterized by overproduction of superoxide, which was confirmed by a conventional dihydroethidium test. In the presence of mito-TEMPO, the intensity of MRI signal in 2-ME/Rot-treated cells was ~30–40% higher, in comparison with that in untreated cells or culture media. In model (cell-free) systems, we observed that superoxide, but not hydrogen peroxide, increased the intensity of T1-weighted MRI signal of mito-TEMPO. Moreover, the superoxide restores the T1-weighted MRI contrast of mito-TEMPOH, a noncontrast (diamagnetic) analogue of mito-TEMPO. This was also confirmed by using EPR spectroscopy. The results demonstrate that superoxide radical is involved in the enhancement of T1-weighted MRI contrast in living cells, in the absence and presence of mito-TEMPO. This report gives a direction for discovering new opportunities for functional MRI, for detection of metabolic activity, accompanied by overproduction of superoxide, as well as by disturbance of the balance between superoxide and hydrogen peroxide, a very important approach to clarify the fine molecular mechanisms in the regulation of many pathologies. The visualization of mitochondrial activity in real-time can be crucial to clarify the molecular mechanism of the functional MRI in its commonly accepted definition, as a method for detection of neurovascular coupling.

**B10. Ivanova D., Z. Zhelev, I. Aoki, R. Bakalova, and T. Higashi. – Overproduction of reactive oxygen species – obligatory or not for induction of apoptosis by anticancer drugs? Chin. J. Cancer Res., 2016, 28(4), 383-396, IF2016 = 3.000 (Q2), SJR = 0,939.**

Много проучвания показват, че конвенционалните противоракови лекарствени средства повишават вътреклетъчните нива на реактивен кислород видове (ROS) и променят редокс-хомеостазата на раковите клетки. Общоприето е схващането, че противораковите ефекти в резултат от приложената химиотерапията, се дължат на индуциране на оксидативен стрес и медиране на ROS-зависима апоптоза в раковите клетки. От другата от страна, увреждащите странични ефекти на конвенционалната противоракова химиотерапия също се дължат на повишеното производство на ROS и нарушаване на редокс-хомеостазата в нормалните клетки и тъкани. Тази статия описва механизмите за задействане и променяне на индукция на апоптоза от активиране на ROS-зависими към ROS-независими пътища. Ние се опитваме да отговорим на въпроса: „Възможно ли е да се предизвика висока специфичност към апоптоза само в ракови клетки, без да се провокира свръхпроизводство на ROS, както и без индуциране на вредни ефекти върху нормалните клетки и тъкани?“ Прегледът също така предлага нова терапевтична стратегия за селективност по отношение на раковите клетки, без значително повлияване върху жизнеспособността на нормалните клетки и тъкани, чрез комбиниране на противоракови лекарствени средства с редокс-модулатори, повлияване на специфични вътреклетъчни сигнални пътища и избягване на оксидативен стрес.

Many studies demonstrate that conventional anticancer drugs elevate intracellular level of reactive oxygen species (ROS) and alter redox-homeostasis of cancer cells. It is widely accepted that anticancer effect of these chemotherapeutics is due to induction of oxidative stress and ROS-mediated apoptosis in cancer. On the other hand, the harmful side effects of conventional anticancer chemotherapy are also due to increased production of ROS and

disruption of redox-homeostasis of normal cells and tissues. This article describes the mechanisms for triggering and modulation of apoptosis through ROS-dependent and ROS-independent pathways. We try to answer the question: “Is it possible to induce highly specific apoptosis only in cancer cells, without overproduction of ROS, as well as without harmful effects on normal cells and tissues?” The review also suggests a new therapeutic strategy for selective killing of cancer cells, without significant impact on viability of normal cells and tissues, by combining anticancer drugs with redox-modulators, affecting specific signaling pathways and avoiding oxidative stress.

- ❖ Резюмета на научни публикации, в издания реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (Web of Science и Scopus), отнасящи се към **група от показатели Г** от минималните национални и допълнителни изисквания към научната и преподавателската дейност на кандидатите за заемане на академична длъжност "доцент".

(публикации **извън** дисертационен труд за придобиване на ОНС “доктор”)

**G1.** Georgieva E., **D. Ivanova**, Z. Zhelev, R. Bakalova, M. Gulubova, and I. Aoki. – Mitochondrial dysfunction and redox imbalance as a diagnostic marker of “free radical diseases”, *Anticancer Res.*, 2017, 37(10), 5373-5381, IF2017 = 1.865 (Q4), SJR = 0,717 (Q2); DOI: 10.21873/anticancerres.11963; <https://ar.iiarjournals.org/content/37/10/5373.abstract>

Вътреклетъчният редокс баланс (редокс статус) е динамична система, която може да се промени чрез много фактори. Митохондриите са едни от най-важните сред тях. Тези органели са основният вътреклетъчен източник на енергия за клетката. Те са от съществено значение за поддържане на клетъчната хомеостаза поради за регулиране на много биохимични процеси. Динамиката на митохондриите се променя по време на различните клетъчни дейности и в някои случаи може да причини свръхпроизводство на реактивни кислородни видове (ROS), което от своя страна насърчава предизвикването на окислително увреждане на ДНК молекулите и повишаване или намаляване на регулацията на различни фосфатази, пролиферативни/антипролиферативни фактори, апоптогични/антиапоптогични фактори и др. Нещо повече, митохондриална дисфункция и вътреклетъчният редокс дисбаланс могат непрекъснато да поддържат и да допринасят за развитието на широк спектър от патологии, наречени „болести на свободните радикали“ (напр. Злокачествените заболявания, невродегенеративните заболявания, атеросклероза, възпаление и др.). Този обзорната статия е фокусирана върху митохондриалната дисфункция и клетъчен редокс статус като отличителен белег на клетъчната хомеостаза и като диагностичен маркер при злокачествени заболявания. Обзорната статия е предназначена за широката читателска аудитория – от студенти до специалисти в областта.

The intracellular redox balance (redox status) is a dynamic system that may change via many factors. Mitochondria are one of the most important among them. These organelles are the main intracellular source of energy. They are essential for maintaining cellular homeostasis due to regulation of many biochemical processes. The mitochondrial dynamics change during cellular activities and in some cases, can cause an overproduction of reactive oxygen species (ROS), which encourages the induction of oxidative DNA damage and up- or down-regulation of phosphatases, proliferative/anti-proliferative factors, apoptotic/anti-apoptotic factors, etc. Moreover, mitochondrial dysfunction and redox imbalance can continuously support and contribute to a wide range of pathologies, termed as “free radical diseases” (e.g., cancer, neurodegeneration, atherosclerosis, inflammation, etc.). This review article is focused on the mitochondrial dysfunction and cellular redox status as a hallmark of cell homeostasis and diagnostic marker of cancer. It is intended to broad readership – from students to specialists in the field.

**Г2. Ivanova D.,** Zh. Zhelev, P. Getsov, B. Nikolova, I. Aoki, T. Higashi, R. Bakalova. - Vitamin K: Redox-modulation, prevention of mitochondrial dysfunction and anticancer effect, *Redox Biology*, 2018, 16, 352-358, IF2018 = 7.793 (Q1), SJR = 2,166 (Q1); DOI:10.1016/j.redox.2018.03.013; <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231718300934?via%3Dihub>

Този преглед е насочен към редокс-модулиращите свойства и противораковия ефект на витамин К. Концепцията на статията е фокусирана върху два аспекта: (i) редокс цикъл на витамин К и неговия ефект върху калциевата хомеостаза, „онкогенен” и “онкосупресивни” реактивни кислородни видове и специфичното индуциране на оксидативен стрес върху ракови клетки; (ii) витамин К в комбинация с витамин С като мощна редокс-система, която образува байпас между митохондриалните комплекси II и III от електрон-транспортната верига и по този начин предотвратява митохондриалната дисфункция, възстановява окислителното фосфорилиране и аеробната гликолиза, модулира редокс-състоянието на вътреклетъчни редокс-двойки, елиминира хипоксичната среда в раковите клетки и индуцира клетката смърт. Анализираните данни предполагат, че витамин С&К може да повиши чувствителността на раковите клетки към конвенционалната химиотерапия, което позволява постигане на по-ниска ефективна доза от лекарственото средство и намаляване на вредните му странични ефекти. Обзорната статия е предназначена за широката читателска аудитория – от студенти до специалисти в областта.

This review is directed to the redox-modulating properties and anticancer effect of vitamin K. The concept is focused on two aspects: (i) redox-cycle of vitamin K and its effect on the calcium homeostasis, “oncogenic” and “onco-suppressive” reactive oxygen species and the specific induction of oxidative stress in cancer; (ii) vitamin K plus C as a powerful redox-system, which forms a bypass between mitochondrial complexes II and III and thus prevents mitochondrial dysfunction, restores oxidative phosphorylation and aerobic glycolysis, modulates the redox-state of endogenous redox-pairs, eliminates the hypoxic environment of cancer cells and induces cell death. The analyzed data suggest that vitamin C&K can sensitize cancer cells to conventional chemotherapy, which allows achievement of a lower effective dose of the drug and minimizing the harmful side-effects. The review is intended for a wide audience of readers - from students to specialists in the field.

**Г3. Yaneva Z., D. Ivanova,** N. Nikolova and M. Tzanova. – The 21st century revival of chitosan in service to bio-organic chemistry, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2020, 34(1), 221 – 237. IF2020 = 1.632 (Q4), SJR = 0,417 (Q3); <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13102818.2020.1731333>

Дизайнът и синтезът на биополимерни нано- и микроформулировки са нова тенденция с нарастващ приоритет в научните изследвания и разработки в областта на биомедицината, биоорганичната/медицинска химия, фармацевтика, агрохимия и хранително-вкусова промишленост. Това включва огромно разнообразие от подобрени и новоразработени аналитични и физико-химични техники за „безвреден“ и ефективен синтез. Обхватът на настоящия преглед е да подчертаят последните постижения в методите за проектиране на нови хитозанови микро- и нано-носители и транспортери. Специален акцентът е поставен върху техните функционалности и капацитет за инкапсулиране на естествени биоактивни съединения, както и тяхното контролирано *in vitro/in vivo* освобождаване в различни биологични/физиологични среди. Прогнозите за прилагането на хитозанови формулировки и хибридни системи на базата на хитозан са за прогресивно нарастване, като познанията относно техните физични, химични и биологични свойства непрекъснато се разширяват. По този начин този преглед предлага обективна оценка относно капацитета, приложимостта и гъвкавостта на новоразработените хибридни системи, базирани на хитозан. Един детайлен интегративен

подход, който включва иновативните научни постижения, базирани върху сложни нови, прецизни и надеждни аналитични процедури и методи за качествени и количествени морфологични, структурни, спектрални, химични и биохимични анализи на биопрекурсори, при които проектираните хитозановите микто/нано-хибридни системи могат да се прилагат. Устойчивите познания относно механизма и методите за инкапсулиране на естествени биоактивни вещества и тяхното *in vitro/in vivo* освобождаването също се разглежда и обсъжда.

The design and synthesis of biopolymer nano- and micro-formulations are a new trend with growing priority in scientific research and development in the fields of biomedicine, bioorganic/medicinal chemistry, pharmaceuticals, agrochemistry and food industry. This incorporates a vast variety of improved and newly-developed analytical and physico-chemical techniques for „green“ and efficient synthesis. The scope of the present review was to outline the recent advances in the methods for design of novel chitosan micro- and nano-carriers and transporters. Special emphasis is laid on their functionalities and capacity for encapsulation of natural bioactive compounds and controlled *in vitro/in vivo* release in various biological/physiological media. Expectations for the application of chitosan formulations and chitosan-based hybrid systems are progressively increasing as the knowledge regarding their physical, chemical and biological properties constantly expands. Thus, this review proposes insights on the objective assessment of the capacity, applicability and versatility of newly-designed chitosan-based hybrid systems. A detailed integrative approach, which incorporates the innovative scientific achievements based on complex novel, precise and reliable analytical procedures and methods for qualitative and quantitative morphological, structural, spectral, chemical and biochemical analyses of the bioprecursors and the designed chitosan-carrier micro/nano-hybrid systems, is applied. Sustainable knowledge on the mechanism and methods of natural bioactive substances encapsulation and *in vitro/in vivo* release is reviewed and discussed.

**Г4. Ivanova D. and Z. Yaneva. - Antioxidant properties and redox-modulating activity of chitosan and its derivatives: biomaterials with application in cancer therapy, BioResearch Open Access, 2020, vol. 9(1), 64–72, SJR2020 = 0,457 (Q3); DOI: 10.1089/biores.2019.0028; <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/biores.2019.0028>**

Много проучвания показват, че метабилозата на митохондриите има основна роля при възникването на канцерогенезата, поради повишаване на нивата на образуване на реактивни кислородни видове (ROS), които повлияват във всички етапи на онкогената трансформация и прогресия на злокачественото заболяване. Общоприето е схващането, че противораковият ефект на конвенционалните химеотерапевтици се дължи на предизвикване на оксидативен стрес и повишаване на вътреклетъчни нива на ROS, които променят редокс-хомеостазата в раковите клетки. От друга страна, увраждащите странични ефекти от конвенционалните химеотерапевтици се дължат и на повишено производство на ROS и нарушаване на редокс-хомеостазата в нормалните клетки и тъкани. Поради това се наблюдава нарастващ интерес към използването на естествените съединения от различни източници, притежаващи антиоксидантна активност, които биха могли да повлияят по различен начин върху редокс-състоянието на раковите клетки и на нормалните клетки и могат да предотвратят увреждане предизвикано от иницирираните окислителни реакции. Известно е, че хитозанът проявява голямо разнообразие от биологично-активно действие, включително биоразградимост, биосъвместимост и има по-малко токсична природа. Поради своите антиоксидантни, антибактериални, противоракови, противовъзпалителни и имуностимулиращи действия, биополимерът се използван в голямо разнообразие от фармацевтични, биомедицински, хранително-вкусови, здравни и селскостопански сектори и е класифициран като нов физиологичен биоактивен материал.

Many studies have shown that mitochondrial metabolism has a fundamental role in induction of carcinogenesis due to the influence of increased levels of reactive oxygen species (ROS) generation in all steps of oncogene transformation and cancer progression. It is widely accepted that the anticancer effect of conventional anticancer drugs is due to induction of oxidative stress and elevated intracellular levels of ROS, which alter the redox homeostasis of cancer cells. On the other hand, the harmful side effects of conventional anticancer chemotherapeutics are also due to increased production of ROS and disruption of redox homeostasis of normal cells and tissues. Therefore, there is a growing interest toward the development of natural antioxidant compounds from various sources, which could impact the redox state of cancer and normal cells by different pathways and could prevent damage from oxidant-mediated reactions. It is known that chitosan exhibits versatile biological properties, including biodegradability, biocompatibility, and a less toxic nature. Because of its antioxidant, antibacterial, anticancer, anti-inflammatory, and immunostimulatory activities, the biopolymer has been used in a wide variety of pharmaceutical, biomedical, food industry, health, and agricultural applications and has been classified as a new physiologically bioactive material.

**G5.** Tzanova M., V. Atanasov, Z. Yaneva, **D. Ivanova**, T. Dinev – Selectivity of current extraction techniques for flavonoids from plant materials, MDPI, Processes, 2020, vol.8, 1222, p. 1-30, IF2020 = 2.847 (Q3), SJR = 0,414 (Q2); <https://doi.org/10.3390/pr8101222>

Флавоноидите имат широк спектър от установени положителни ефекти върху здравето на хората и животните. Те намират приложение в медицината за терапия на заболявания и химиопрофилактика, откъдето интересът към тях се увеличава. Освен това се използват в хранителната и козметичната промишленост като пигменти и биоконсерванти. Растенията са неизчерпаем източник на флавоноиди. Най-важната стъпка от преработката на растителна суровина е екстракцията и изолирането на целевите съединения. Качеството на екстракта и ефективността на процедурата се влияят от няколко фактора: растителен материал и подготовка на пробите за предварително извличане, вид разтворител, техника на екстракция, физикохимични условия и т.н. Настоящият преглед обсъжда общите проблеми и ключовите предизвикателства на екстракционните процедури и различните механизми за селективно извличане на флавоноиди от различни растителни източници. В обобщение, няма универсален метод на екстракция и всяка оптимизирана процедура е индивидуална за съответните растения. За да бъде селективна техниката на екстракция, тя трябва да комбинира оптимален разтворител или смес от разтворители с подходяща техника. Не на последно място, оптимизацията му е важна за различни приложения. Освен това, когато избраният метод трябва да бъде стандартизиран, той трябва да постигне приемлива степен на повтаряемост и възпроизводимост.

Flavonoids have a broad spectrum of established positive effects on human and animal health. They find an application in medicine for disease therapy and chemoprevention, whence the interest in flavonoids increases. In addition, they are used in food and cosmetic industries as pigments and biopreservatives. Plants are an inexhaustible source of flavonoids. The most important step of plant raw material processing is extraction and isolation of target compounds. The quality of an extract and efficiency of a procedure are influenced by several factors: Plant material and pre-extracting sample preparation, type of solvent, extraction technique, physicochemical conditions, etc. The present overview discusses the common problems and key challenges of the extraction procedures and the different mechanisms for selective extraction of flavonoids from different plant sources. In summary, there is no universal extraction method and each optimized procedure is individual for the respective plants. For an extraction technique to be selective, it must combine an optimal solvent or mixture of solvents with an appropriate technique. Last but not least, its optimization is important for a variety of applications. Moreover, when the selected method needs to be standardized, it must achieve acceptable degree of repeatability and reproducibility.

**Г6.** Bakalova R., S. Semkova, **D. Ivanova**, Z. Zhelev, T. Miller, T. Takeshima, S. Shibata, D. Lazarova, I. Aoki, T. Higashi. – Selective targeting of cancerous mitochondria and suppression of tumor growth using redox-active treatment adjuvant, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, art. number 6212935, IF2020 = 6.543 (Q2), SJR = 1.494 (Q1)

Веществата, които повлияват редокс-статуса на клетките и техните комбинации, например хинон/аскорбат и менадион/аскорбат (M/A; наричан още Apatone®), заслужават внимание заради способността си да убиват раковите клетки, без да влияят върху жизнеспособността на нормалните клетки, проявявайки синергичен ефект. Основният механизъм на действие на M/A спрямо раковите клетки до момента не се е свързвал с митохондриите. Целта на настоящото изследване е да проучи дали тази комбинация повлиява върху функцията на митохондриите на туморните клетки. Експериментите са направени върху ракови клетъчни линии (Jurkat, Colon26 и MCF7) и нормални клетки (нормални лимфоцити, FHC и MCF10A), третирани с различни концентрации на менадион, аскорбат и/или тяхната комбинация (2/200, 3/300, 5/500, 10/1000 и 20/2000  $\mu\text{M}/\mu\text{M}$  от M/A). M/A в комбинация специфично потиска растежа на туморните клетки, като се наблюдава синергичен ефект. Приложената комбинация на двата препарата не влияе на жизнеспособността на нормалните клетки при фармакологични концентрации. При третираните с M/A туморни клетки цитостатичният/цитотоксичният ефект е придружен от (i) производство на митохондриален супероксид във високи концентрации (до 15 пъти над контролното ниво), (ii) значително намаляване на митохондриалния мембранен потенциал, (iii) намаляване на нивата на АТФ, сукцинат, NADH и NAD<sup>+</sup> и (iv) намалена експресия на PD-L1 (експресирани върху повърхността на туморните клетки и имунните клетки при различните видове онкологични заболявания). Изброените ефекти са дозо-зависими. Инхибирането на NQO1 от дикумарол повишава нивата на митохондриалния супероксид и увеличава чувствителността на туморните клетки към M/A. При нормалните (неракови) клетки M/A индуцира относително ниско и независимо от дозата повишаване на митохондриалния супероксид и „слаб“ оксидативен стрес. Тези данни предполагат, че противотуморният ефект на M/A е резултат от специфичен механизъм, тясно свързан с митохондриите на туморните клетки. При ниски/умерени дози на M/A (1/100-3/300  $\mu\text{M}/\mu\text{M}$ ), които могат да се достигнат с перорален прием и парентерално (инжекционно), M/A увеличава чувствителността на туморните клетки към конвенционалните противоракови средства, което се проявява синергично, с увеличена цитотоксичност, придружена от повишена индукция на апоптоза. Изследвани са комбинации от M/A с 13 противоракови лекарства (ABT-737, барасертиб, блеомицин, BEZ-235, бортезомиб, цисплатин, еверолимус, ломустин, лонафарниб, MG-132, MLN-2238, палбоциклиб и PI-103). Ниските/умерени дози на M/A не предизвикват необратима цитотоксичност в туморните клетки, но причиняват необратими метаболитни промени, включително: (i) намаляване на сукцината и NADH, (ii) деполяризация на митохондриалната мембрана и (iii) свръхпродукция на супероксид, само в митохондриите на раковите клетки. В допълнение, M/A потиска туморния растеж *in vivo*, след перорално приложение при мишки с меланом, лекувани с препарати понижаващи експресията на PD-L1 в меланомните клетки. Експерименталните данни показват увеличаване чувствителността на туморните клетки към конвенционалните химиотерапевтици след прилагане на M/A, като междуременно не повлияват нераковите клетки. Предполагаме, че M/A обусловените противотуморни ефекти са предизвикани от окислително-редукционното взаимодействие на двете вещества. Предполага се, че M/A има отношение и към имунната реакция, правейки раковите клетки „достъпни“ и респективно уязвими към естествения имуноен отговор.

Redox-active substances and their combinations, such as of quinone/ascorbate and in particular menadione/ascorbate (M/A; also named Apatone®), attract attention with their unusual ability to kill cancer cells without affecting the viability of normal cells as well as with the synergistic anticancer effect of both molecules. So far, the primary mechanism of M/A-mediated anticancer effects has not been linked to the mitochondria. The aim of our study was to clarify whether this “combination drug” affects mitochondrial functionality specifically in cancer cells. Studies were conducted on cancer cells (Jurkat, Colon26, and MCF7) and normal cells (normal lymphocytes, FHC, and MCF10A), treated with different concentrations of menadione, ascorbate, and/or their combination (2/200, 3/300, 5/500, 10/1000, and 20/2000  $\mu\text{M}/\mu\text{M}$  of M/A). M/A exhibited highly specific and synergistic suppression on

cancer cell growth but without adversely affecting the viability of normal cells at pharmacologically attainable concentrations. In M/A-treated cancer cells, the cytostatic/cytotoxic effect is accompanied by (i) extremely high production of mitochondrial superoxide (up to 15-fold over the control level), (ii) a significant decrease of mitochondrial membrane potential, (iii) a decrease of the steady-state levels of ATP, succinate, NADH, and NAD<sup>+</sup>, and (iv) a decreased expression of programmed cell death ligand 1 (PD-L1)—one of the major immune checkpoints. These effects were dose dependent. The inhibition of NQO1 by dicoumarol increased mitochondrial superoxide and sensitized cancer cells to M/A. In normal cells, M/A induced relatively low and dose-independent increase of mitochondrial superoxide and mild oxidative stress, which seems to be well tolerated. These data suggest that all anticancer effects of M/A result from a specific mechanism, tightly connected to the mitochondria of cancer cells. At low/tolerable doses of M/A (1/100-3/300  $\mu\text{M}/\mu\text{M}$ ) attainable in cancer by oral and parenteral administration, M/A sensitized cancer cells to conventional anticancer drugs, exhibiting synergistic or additive cytotoxicity accompanied by impressive induction of apoptosis. Combinations of M/A with 13 anticancer drugs were investigated (ABT-737, barasertib, bleomycin, BEZ-235, bortezomib, cisplatin, everolimus, lomustine, lonafarnib, MG-132, MLN-2238, palbociclib, and PI-103). Low/tolerable doses of M/A did not induce irreversible cytotoxicity in cancer cells but did cause irreversible metabolic changes, including: (i) a decrease of succinate and NADH, (ii) depolarization of the mitochondrial membrane, and (iii) overproduction of superoxide in the mitochondria of cancer cells only. In addition, M/A suppressed tumor growth in vivo after oral administration in mice with melanoma and the drug downregulated PD-L1 in melanoma cells. Experimental data suggest a great potential for beneficial anticancer effects of M/A through increasing the sensitivity of cancer cells to conventional anticancer therapy, as well as to the immune system, while sparing normal cells. We hypothesize that M/A-mediated anticancer effects are triggered by redox cycling of both substances, specifically within dysfunctional mitochondria. M/A may also have a beneficial effect on the immune system, making cancer cells “visible” and more vulnerable to the native immune response.

**Г7.** Yaneva Z., E.B. Simeonov and **D.G. Ivanova.** – In vitro ultraviolet-B radiation mediated antioxidant response of Bulgarian Goldenrod (*Solidago virgaurea L.*) extract, Bulgarian Chemical Communications, 2020, 52, 33-40. SJR<sub>2020</sub> = 0,179 (Q4).

Увреждащото ултравиолетово В (UVB) лъчение е важна част от слънчевия електромагнитен спектър, чиито сезонни и дългосрочни нива вероятно ще останат повишени за десетилетия напред. Поради високата чувствителност на растенията към UVB радиация, те трябва да реагират бързо, за да намалят образуването на повърхността реактивни кислородни видове (ROS). Повишените нива на ROS на клетъчно ниво причиняват окисляване на протеини, липиди и други биомолекули, като по този начин застрашават функционалността и целостта на ензимите системи и клетъчни мембрани компоненти.

Настоящото проучване за първи път съобщава за радикал-улавящата, антиоксидант-защитната активност и стабилната структура на екстракта получен от *Solidago virgaurea L.* преди и след излагане на UVB радиация. Съставът на химически чистия (97 %) екстракт се установява в необработените и в третирани с UVB проби чрез RP-HPLC анализ. Чрез директна EPR спектроскопия се установиха единични симетрични EPR сигнали както в необработени проби ( $g = 2,0043 \pm 0,0003$ ), така и в обработени с UVB проби ( $g = 2,0054 \pm 0,0002$ ). Интензитетът на EPR сигналите на двата екстракта показват възможно образуване на стабилни радикални структури. Трябва да се отбележи, че в екстракта са регистрирани стабилни радикални структури 2 и 6 месеца след UVB-индуцираното окисление. Освен това, както нетретирани, така и UVB-облъчените екстракти от *S. virgaurea L.* показаха добре изразени способности за улавяне на радикали и антиоксидантно-протективни свойства срещу реактивни видове като азотен оксид (NO), редуциращи агенти, неензимен 2,2-азинобис (ABTS<sup>•+</sup>) структури, супероксиден анион радикал и DPPH стабилни радикали. Настоящите резултати характеризират екстракта от *S. virgaurea L.* като обещаващ ROS-улавящ антиоксидант с UVB-защитни свойства и очертават бъдещата му приложимост за разработването на нови слънцезащитни медикаменти.

Damaging Ultraviolet B (UVB) radiation is an important part of the solar electromagnetic spectrum, which seasonal and long-term levels are likely to remain elevated for decades to come. Due to the high sensitivity of plants to UVB radiation, they need to react quickly to minimize surface reactive oxygen species (ROS) mediation. The increased levels of ROS, at cellular level, causes oxidation of proteins, lipids, and other biomolecules, thus jeopardizing enzymes and cell membranes functionality and integrity.

The present study for the first time reported the radical-scavenging, antioxidant-protective properties and stable structure of *Solidago virgaurea L.* extract before and after exposure to UVB radiation. The composition of the chemically pure (97 %) extract was established in the untreated and in the UVB-treated samples by RP-HPLC. By direct EPR spectroscopy, single symmetrical EPR signals were established in both untreated samples ( $g = 2.0043 \pm 0.0003$ ) and UVB-treated samples ( $g = 2.0054 \pm 0.0002$ ). The intensities of the EPR signals of both extracts demonstrated a possible formation of stable radical structures. It should be pointed out that stable radical structures were registered in the extract 2 and 6 months after the UVB-induced oxidation. Furthermore, both untreated and UVB-irradiated *S. virgaurea L.* extracts showed well-expressed radical-scavenging abilities and antioxidant-protective properties against reactive species such as nitric oxide (NO), reducing agents, non-enzymatic 2,2-azinobis (ABTS•+) structures, superoxide anion and DPPH stable radicals. The current results characterize the *S. virgaurea L.* extract as a promising ROS-scavenging antioxidant with UVB-protective properties, and outline its future applicability for the development of new photo-medications.

**Г8.** Yaneva Z., D. Ivanova, G. Beev and K. Besheva. – Quantification of catechin in *Acacia catechu* extract by non-derivative, first derivative UV/Vis spectrophotometry and FT-IR spectroscopy, Bulgarian Chemical Communications, 2020, 52, 41 – 47. SJR2020 = 0,179 (Q4).

Целта на настоящото изследване беше да се определи количествено на катехин в изсушен чрез пулверизиране екстракт от *Acacia catechu*, чрез прилагане на непроизводна (ND), първа производна (FD) UV/Vis спектрофотометрия и FT-IR спектроскопия. Методологията на ND при pH = 7,9 се доказва като най-чувствителната, линейна, прецизна, проста и точна методика сред всички прилагани методи. Съдържанието на катехин в две серии от по 12 разтвора от екстракт на *Acacia catechu* (70% EtOH) съответно при pH = 4.0 и pH = 7.9, се определя чрез вече разработените UV/Vis ND методи. Статистическите анализи между експерименталните данни от двете серии, получени от двете техники, се оказаха статистически значими. Най-високото съдържание на катехин в неразредения етанолов екстракт на *Acacia catechu* е количествено определено като 169,88 mg/L при pH = 7,9 и 171,52 mg/L при pH = 4,0. Сравнителните анализи на FT-IR спектрите на чист катехин и екстракт от *Acacia catechu* в прахообразна форма и незначителните отклонения в ширината и интензитета на лентите, несъмнено доказаха високото съдържание на естествения антиоксидант в растителния екстракт. Последното заключение се подкрепя от установения значителен среден процент на възстановяване (97,17%) на катехин в суровия растителен екстракт.

The aim of the present study was to quantify catechin in spray-dried extract of *Acacia catechu* by applying non-derivative (ND), first derivative (FD) UV/Vis spectrophotometry and FT-IR spectroscopy. The ND methodology at pH = 7.9 demonstrated to be the most sensitive, linear, precise, simple and accurate among all applied methods. Catechin content in two series of 12 *Acacia catechu* extract solutions (70% EtOH) at pH = 4.0 and pH = 7.9, respectively, was determined by the developed UV/Vis ND methods. The statistical analyses between the experimental data sets obtained by both techniques proved to be statistically significant. The highest catechin content in the non-diluted ethanol *Acacia catechu* extract was quantified as 169.88 mg/L at pH = 7.9 and 171.52 mg/L at pH = 4.0. The comparative analyses of the FT-IR spectra of pure catechin and *Acacia catechu* extract in powdered form and the insignificant bands width and intensity deviations proved undoubtedly the high content of the natural antioxidant in the plant extract. The latter conclusion was sustained by the established significant average percent recovery (97.17%) of catechin in the raw plant extract.



**Г9.** Yaneva Z. and D. Ivanova. – Catechins within the biopolymer matrix-design concepts and bioactivity prospects, *Antioxidants*, 2021, 9(12), art. number 1180. IF2020 = 6.313 (Q1), SJR = 1,067 (Q2); DOI: 10.3390/antiox9121180; <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/12/1180>

Епидемиологични проучвания и клинични изпитвания предполагат, че екстрактите от катехини сами по себе си не могат да осигурят достатъчно ниво на биоактивност и обещаващи терапевтични ефекти за постигане на ползи за здравето поради редица ограничения, свързани с лоша орална абсорбция, ограничена бионаличност, чувствителност към окисляване и т.н. Съвременни научни изследвания съобщават за множество техники за проектиране на микро- и нано-био-доставящи системи като нови и обещаващи стратегии за преодоляване на тези препятствия и за повишаване на терапевтичната активност на катехините. Обективната оценка на ползите от тях обаче изисква критична сравнителна оценка на предимствата и недостатъците на проектираните системи катехини-бионосители, тяхната биологична активност и административни аспекти по отношение на безопасността. В това отношение настоящият преглед обективно очертава, сравнява и оценява последните постижения, свързани с новоразработените дизайнерски концепции за инкапсулиране на катехините в различни биополимерни носители и тяхното поведение при освобождаване, със специален акцент върху специфичните физиологични биофункционалности на иновативния биофлавоноид/биополимер системи за доставка.

Epidemiological studies and clinical investigations proposed that catechins extracts alone may not provide a sufficient level of bioactivities and promising therapeutic effects to achieve health benefits due to a number of constraints related to poor oral absorption, limited bioavailability, sensitivity to oxidation, etc. Modern scientific studies have reported numerous techniques for the design of micro- and nano-bio-delivery systems as novel and promising strategies to overcome these obstacles and to enhance catechins' therapeutic activity. The objective assessment of their benefits, however, requires a critical comparative estimation of the advantages and disadvantages of the designed catechins-biocarrier systems, their biological activities and safety administration aspects. In this respect, the present review objectively outlines, compares and assesses the recent advances related to newly developed design concepts of catechins' encapsulation into various biopolymer carriers and their release behaviour, with a special emphasis on the specific physiological biofunctionalities of the innovative bioflavonoid/biopolymer delivery systems.

**Г10.** Semkova S., D. Ivanova, B. Nikolova, G. Zlateva, R. Bakalova, Z. Zhelev, I. Aoki – Inhibition of ATP-synthase potentiates cytotoxicity of combination drug menadione/ascorbate in leukemia lymphocytes, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2021, 35(1), 1738 – 1744. IF2020 = 1.632 (Q4), SJR = 0,417 (Q3); <https://doi.org/10.1080/13102818.2021.1996268>

Комбинираното лекарство менадион/аскорбат (М/А) проявява синергичен, дозозависим, антипролиферативен и цитотоксичен ефект спрямо раковите клетки, но не и спрямо нормалните клетки от същия произход, особено в концентрации, които могат да бъдат постигнати *in vivo* чрез пероралното им, както и чрез парентералното им приложение. Предполага се, че М/А въздейства селективно върху дисфункционализиращите митохондрии на ракови клетки. Точният молекулен механизъм обаче все още не е ясен. Целта на настоящото изследване бе да се изясни ролята и на аденозинтрифосфат (АТФ) синтазаната активност и нейното супресирание чрез олигомицин-А върху индуцираната от М/А цитотоксичност, образуване на митохондриален супероксид анион радикал и нивото на АТФ при левкемични лимфоцити. Клетките бяха третирани с различни концентрации на М/А в отсъствие и в присъствие на олигомицин-А (100 ng/mL) за 24 часа и 48 часа. С помощта на конвенционални аналитични методи бяха анализирани клетъчният растеж и жизнеспособност, нивата на АТФ и митохондриалния супероксид анион радикал. Резултатите показват, че потискането на активността на АТФ синтазата от олигомицин-А води до намалява клетъчния растеж и жизнеспособност и увеличаване на производството на митохондриален супероксид, както и изчерпването на

АТФ в клетки, третирани с ниски/поносими дози М/А (до 5/500  $\mu\text{M}/\mu\text{M}$ ), в сравнение с клетките третирани само с М/А. Олигомицин-А не повлиява тези параметри в клетките, третирани с висок дози от М/А (10/1000 и 20/2000  $\mu\text{M}/\mu\text{M}$ ). Инхибирането на АТФ синтазата насърчава цитотоксичност на М/А, особено при левкемични лимфоцити, третирани с ниски/поносими дози. Ние приемем, че цитотоксичността на М/А е тясно свързана с инициране на увреждане на оксидителното фосфорилиране, както и че изчерпването на митохондриалния АТФ е решаващ фактор за клетъчната смърт.

The combination drug menadione/ascorbate (M/A) manifests synergistic dose-dependent antiproliferative and cytotoxic effects towards cancer cells, but not towards normal cells of the same origin especially at concentrations that can be achieved *in vivo* by its oral and parenteral administration. It is assumed that M/A alters selectively dysfunctional cancerous mitochondria. However, the exact molecular mechanism is not clear yet. The aim of the present study was to elucidate the role of adenosine triphosphate (ATP) synthase activity and its suppression by oligomycin-A on M/A-induced cytotoxicity, mitochondrial superoxide and ATP level in leukaemic lymphocytes. Cells were treated with different concentrations of M/A in the absence and presence of oligomycin-A (100 ng/mL) for 24 h and 48 h. The cell growth and viability, steady-state ATP level and mitochondrial superoxide were analysed using conventional analytical tests. The results showed that suppression of ATP synthase activity by oligomycin-A decreased the cell growth and viability and increased the production of mitochondrial superoxide and depletion of ATP in cells treated with low/tolerable doses of M/A (up to 5/500  $\mu\text{M}/\mu\text{M}$ ), compared to the cells treated with M/A only. Oligomycin-A did not affect these parameters in cells treated with high doses of M/A (10/1000 and 20/2000  $\mu\text{M}/\mu\text{M}$ ). The inhibition of ATP synthase potentiated the cytotoxicity of M/A, particularly in leukaemic lymphocytes treated with low/tolerable doses. We assume that the cytotoxicity of M/A is tightly connected to impairment of oxidative phosphorylation, and mitochondrial ATP depletion is a crucial factor for cell death.

**Г11.** Yaneva Z., D. Ivanova and N. Popov – Clinoptiolite microparticles as carriers of catechin-rich *Acacia catechu* extracts: microencapsulation and *in vitro* release study, *Molecules*, 2021, 26(6), art. number 1655. IF2020 = 4.412 (Q2), SJR = 0,782 (Q1); DOI: 10.3390/molecules26061655; <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/6/1655>.

Основната цел на настоящото изследване е да се анализира микрокапсулирането, капацитета на *in vitro* освобождаване и ефективността на богатият на катехин екстракт от *Acacia catechu* с помощта на микрочастици Clinosorbent-5 (CLS-5), чрез прилагане на задълбочени подробни анализи и математическо моделиране на инкапсулирането и кинетиката на *in vitro* освобождаване на полифенол-минералната композиционна система. Инкапсулирането на биофлаванола и ефективността на неговото освобождаване върху/от минералната матрица бяха оценени чрез сорбционни експерименти и интерпретативно моделиране на експерименталните данни. Повърхностните и спектрални характеристики на естественото биоактивно вещество, както и на неорганичния микроносител са определени чрез Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) и чрез Ultraviolet/Visible (UV/Vis) спектрофотометрични анализи. Максималната степен на микрокапсулиране на катехин в кисела среда е 32%. Кинетичното проучване на *in vitro* освобождаването му в симулирана стомашна среда без ензими (pH = 1,2) утвърди 88% максимална ефективност на освобождаване, постигната след 24 часа. Профилът на *in vitro* освобождаване показва, че разработената микроносителна система биофлаванол/клиноптилолит осигурява продължително *in vitro* поведение на освобождаване на катехин, без първоначален ефект на взрив. Следователно резултатите от настоящото изследване са от съществено значение за дизайна и разработване на иновативни катехин-CLS-5 микроносителни системи за приложение при хоманната и ветеринарна медицина.

The main goal of the present study was to investigate the microencapsulation, *in vitro* release capacity and efficiency of catechin-rich *Acacia catechu* extract by Clinosorbent-5 (CLS-5) microparticles by in-depth detailed analyses and mathematical modelling of the encapsulation and *in vitro* release kinetics behaviour of the polyphenol-mineral composite system. The bioflavanol encapsulation and release efficiency on/from the mineral matrix were

assessed by sorption experiments and interpretative modelling of the experimental data. The surface and spectral characteristics of the natural bioactive substance and the inorganic microcarrier were determined by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Ultraviolet/Visible (UV/Vis) spectrophotometric analyses. The maximum extent of catechin microencapsulation in acidic medium was 32%. The *in vitro* release kinetics study in simulated enzyme-free gastric medium (pH = 1.2) approved 88% maximum release efficiency achieved after 24 h. The *in vitro* release profile displayed that the developed bioflavanol/clinoptilolite microcarrier system provided sustained catechin *in vitro* release behavior without an initial burst effect. Thus, the results from the present study are essential for the design and development of innovative catechin-CLS-5 microcarrier systems for application in human and veterinary medicine.

**Г12.** Yaneva Z., E. Simeonov, N. Rusenova, **D. Ivanova**, G. Nikolova, Y. Karamalakova, C. Chlev and G. Beev. – Flavonoids extraction kinetics, antimicrobial activity and radical scavenging potential of Bulgarian Woundwort (*Solidago virgaurea L.*), *Separations*, 2022, 9(2), art. number 27. IF<sub>2020</sub> = 2.777 (Q3), SJR = 0,485 (Q2)

Лечебното растение златна пръчица (*Solidago virgaurea L.*) се характеризира с диуретично, антимуtagenно, противовъзпалително действие и се прилага при лечение на инфекции в пикочните пътища, нефролитиаза, както и при лечение на заболявания на простатата. Целта на настоящото изследване е да се анализира кинетиката на екстракция на катехин, епигалокатехин и кверцетин, изолирани от екстракти на българска златна пръчица, за да се оцени нейния антибактериален потенциал на действие срещу четири бактериални щамове (*Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и *Bacillus cereus*), както и нейния антиоксидантен капацитет и потенциал за улавяне на радикалови структури. Концентрациите на флавоноидите в екстрактите, получени при различни екстракционни условия (разтворител, температура, време на екстракция) бяха определени чрез новоразработени от научния екип RP-HPLC-PDA методологии. Методът на дифузия през агара беше приложен като метод за оценка на антибактериалната активност на растителните екстракти. Получените екстракти в 70% EtOH при 20 °C показват значително по-висока антибактериална активност срещу храните патогенни бактерии *S. aureus* и *P. Aeruginosa*, в сравнение с тези получени при 70% и 98% EtOH и съответно при 30° C и 20° C температури. Лечебното растение проявява задоволителен антиоксидантен потенциал и радикал-улавяща активност.

The medicinal plant woundwort (*Solidago virgaurea L.*) characterizes by diuretic, antimutagenic, anti-inflammatory activity and it has been applied for urinary tract, nephrolithiasis and prostate disorders treatment. The aim of the present study was to analyze the extraction kinetics of catechin, epigallocatechin and quercetin from Bulgarian woundwort extracts, to assess the antibacterial potential of the medicinal plant extracts against four bacterial strains (*Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Bacillus cereus*), their antioxidant capacity and radical scavenging potential. The concentrations of the flavonoids in the extracts obtained at different extraction conditions (solvent, temperature, extraction time) were determined by newly-developed by the scientific team RP-HPLC-PDA methodologies. The agar well diffusion method was applied to evaluate the antibacterial activity of the plant extracts. The 70% EtOH extracts at 20 C displayed significantly higher antibacterial activity against the foodborne pathogenic bacteria *S. aureus* and *P. aeruginosa* as compared to the 70% and 98% EtOH extracts at 30° C and 20° C, respectively. The medicinal plant exhibited satisfactory antioxidant potential and radical-scavenging activity.

**Г13.** Nikolova N., **D. Ivanova**, and Z. Yaneva. – *In vivo* radioprotective potential of newly synthesized azomethine and styrylquinoline derivatives and a natural polyphenol: a preliminary

study, Life-Basel, 2022, 12(3), art. number 346. IF<sub>2020</sub> = 3.817 (Q2); DOI: 10.3390/life12030346; <https://www.mdpi.com/2075-1729/12/3/346>.

Целта на настоящото изследване е да се анализира радиопротективната активност на силимарин, растителна субстанция с хепатопротективна активност, както и на четири новосинтезирани структурни производни на азометини на антраилова киселина и алкил-2-стирилхинолинова киселина и да се оцени влиянието на вида на разтворителя и на дозата на биоактивното съединение върху *in vivo* радиопротективният им потенциал. Плъхове от вида Wistar с тегло 110–120 g бяха използвани при *in vivo* експериментите. Петнадесет минути след *i.p.* инжектиране на съединенията, опитните животни бяха облъчени с 8 Gy. Резултатите показват, че съединението 2-[[3,5-дихидро-2-хидроксифенил]метилен] амино}-бензоена киселина в доза от 60 mg/kg телесно тегло проявява най-висок радиопротективен ефект, докато естественият екстракт силимарин не проявяват радиопротективен потенциал, дори при високи дози.

The aim of the present study was to investigate the radioprotective activity of silymarin, a plant substance with hepatoprotective activity, of four newly synthesized structural derivatives of anthranilic acid azomethines, and alkyl-2-styrylquinolinic acid, as well as to establish and assess the influence of the solvent type and bioactive compound dose on the *in vivo* radioprotective potential of the natural and novel synthetic compounds. Male Wistar strain rats weighing 110–120 g were used for the *in vivo* experiments. Fifteen minutes after *i.p.* injection of the compounds, the experimental animals were irradiated by 8 Gy. Results indicate that the compound 2-[[3,5-dihydro-2-hydroxyphenyl)methylen] amino}-benzoic acid in a dose of 60 mg/kg body weight exhibited the highest radioprotective effect, whereas the natural extract silymarin did not manifest radioprotective potential, even in high doses.

**G14.** Yaneva Z., D. Ivanova, N. Nikolova and M. Toneva. – Organic dyes in contemporary medicinal chemistry and biomedicine. I. From the chromophore to the bioimaging/bioassay agent, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2022, 36(1), 1 – 14. IF<sub>2020</sub> = 1.632 (Q4), SJR = 0,417 (Q3).

Настоящият преглед беше провокиран от изискването за цялостен преглед на последните научни постижения, разкриващи нови хоризонти за съвременното приложения на органични багрила в услуга на модерната медицинска химия, фармация и биомедицина. Прегледът очертава основните структурни характеристики, физикохимичните свойства и биологичната активност на различни семейства багрила и предлага модифицирани класификации на багрилата според техните структурни характеристики и биоорганични функционалности, обслужващи нуждите на съвременната аналитична химия и биохимия. Основна част от прегледа се фокусира върху предимствата и недостатъците при използването на багрила като вектори в биоаналитичните анализи. Последното се основава на сравнителни анализи на ограниченията на някои широко прилагани класически методологии срещу предимствата и резултатите от приложението на новоразработени молекули на багрилото в съвременните техники за биоанализи, базирани на багрила.

The present review was provoked by the demand of a comprehensive overview on the recent scientific achievements revealing new horizons for advanced applications of organic dyes in service of contemporary medicinal chemistry, pharmacy and biomedicine. The review outlines the basic structural characteristics, physicochemical properties and biological activity of various dye families and suggests modified classifications of dyes according to their structural moieties and bioorganic functionalities serving the necessities of modern analytical chemistry and biochemistry. A major part of the review focuses on the pros and cons of the use of dyes as vectors in bioanalytical assays. The latter is based on comparative analyses of the limitations of some widely applied classical methodologies vs. the advantages and outcomes of the application of newly-designed dye molecules in modern dye-based bioassay techniques.

(публикации във връзка с дисертационен труд за придобиване на ОНС “доктор”)

**A1. Ivanova D., D. Lazarova, E. Georgieva, I. Aoki, Z. Zhelev and R. Bakalova - Systematic study on the cytotoxic and/or cytostatic effects of over twenty anticancer drugs: The crucial importance of the analytical approach and data processing, Anticancer Res., 2014, 34(10), 5825-5827 (short paper). IF=1.826**

Целта на настоящата работа е да се изясни цитотоксичния ефект на противоракови вещества, чрез използване на високо стандартизиран аналитичен подход и прецизна обработка на данните. Над двадесет противоракови препарата (ново поколение) са тествани върху култивирани клетъчни линии. Изследвани са клетъчната жизнеспособност и пролиферация и са приложени различни подходи при обработката на данните. Въз основа на конвенционалния подход за изчисляване на жизнеспособността на клетките, като процент от съответната контрола, всички лекарства могат да бъдат характеризирани като цитотоксични. Въз основа на ефекта на лекарствения средства върху броя на жизнеспособните клетки във всяка третирана проба (в сравнение с първоначалната стойност), препаратите могат да бъдат разделени в три групи: (i) цитотоксични лекарства; (ii) силно цитостатични лекарства, но не цитотоксични; (iii) лекарства без ефект върху клетъчната жизнеспособност и със сравнително слаб цитостатичен ефект. Изследването показва важноста на аналитичния подход и обработката на данните. Задължително е да се контролира ефектът на лекарствения средство върху броя на жизнеспособните ракови клетки по време на лечението, в сравнение с първоначалната стойност. В повечето случаи раковите клетки остават живи в присъствието на лекарствения препарат (в зависимост от избраната доза) и е въпрос на време тези клетки да започнат да се размножават отново след прекратяване на терапията.

The aim of this study was to clarify the real cytotoxic effect of anticancer substances by using a highly standardized analytical approach and precise data processing. Over twenty anticancer drugs (new generation) were tested on cultured cell lines. Cell viability and proliferation were analysed and different data processing was applied. Based on the conventional approach for calculation of cell viability as a percentage from the respective control all drugs could be characterized as cytotoxic. Based on the effect of the drugs on the number of viable cells in each treated sample (compared to the initial value) they could be divided in three groups: (i) cytotoxic drugs; (ii) strongly cytostatic drugs, but not cytotoxic; (iii) drugs without effect on cell viability and with comparatively weak cytostatic effect. The study shows the crucial importance of the analytical approach and the data processing. It is obligatory to control the effect of the drug on the number of viable cancer cells during the treatment, comparing to the initial value. In most cases, the cancer cells stay alive in the presence of the drug (depending on the selecting dose) and it is a matter of time these cells to start proliferating again after termination of the treatment.

**A2.** Georgieva E., D. Ivanova, D. Lazarova, R. Bakalova, I. Aoki, Z. Zhelev - In vitro analysis of redox status of normal and tumor cells using nitroxide radicals and EPR spectroscopy, *Anticancer Res.*, 2014, 34(10), 5917-5919 (short paper). IF=1.826.

Предмет на настоящото изследване е динамиката на EPR сигнала за регистриране на редокс-статус *in vitro* на нормални и ракови клетки с използване на два нитроксидни радикала (methoxy-TEMPO и mito-TEMPO). Нитроксидните радикали (които се характеризират с EPR контраст) участват в реакции на електронен обмен с множество вътреклетъчни окислителни и редуциращи еквиваленти. Скоростните константи на тези реакции определят динамиката на EPR сигнала в клетъчната суспензия. В нормалните, неракови клетки EPR сигналът на нитроксидите значително се понижава по време на инкубацията. При раковите клетки интензитетът на EPR сигнала е почти постоянен в рамките на два часа след инкубацията и не намалява значително. Данните показват, че нераковите клетки се характеризират с висок редуциращ капацитет и превръщане на нитроксидния радикал в диамагнитен хидроксиламин, докато раковите клетки се характеризират с висок оксидативен капацитет. Описаната методология е подходяща за диференциация на ракови от неракови клетки въз основа на техния редокс-статус.

In the present study we describe *in vitro* imaging analysis of cellular redox status in cancer and non-cancer cells using two redox-sensitive nitroxide derivatives (methoxy-TEMPO and mito-TEMPO) and electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. The nitroxide radical (which is characterized by EPR contrast) participates in electron-transfer reactions with a variety of intracellular oxidative and reducing equivalents. The rate constants of these reactions determine the EPR signal dynamics in cell suspension. In non-cancer cells, EPR signal intensity of nitroxides decreased significantly during incubation. In cancer cells, EPR signal intensity was almost constant within two hours of incubation and did not decrease significantly. The data suggest that non-cancer cells are characterized by a higher reducing activity to the nitroxide radical, while cancer cells are characterized by a higher oxidative activity. The described methodology is an appropriate sensing platform for differentiation of cancer from non-cancer cells based on their redox status.

**A3.** Ivanova D., R. Bakalova, D. Lazarova, V. Gadjeva and Z. Zhelev - The impact of reactive oxygen species on anticancer therapeutic strategies, *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2013, 22(6), 899-908. IF=0.333

Над 50-годишният опит в изучаване на активните форми на кислорода и тяхното отношение към биологията и медицината показва, че нормалните здрави клетки на бозайниците се характеризират с ниско ниво на активните форми на кислорода (ROS) и постоянно (референтно) ниво на редуциращи еквиваленти. Трайното повишаване на ROS над критичното ниво води до постоянен оксидативен стрес в клетките. Това може да причини нестабилност на генома и мутации, които са отговорни за адаптацията на клетките към оксидативен стрес и тяхното оцеляване. На свой ред тези мутации могат да провокират злокачествено заболяване. Общоприето е, че балансът между ROS и редуциращите еквиваленти в клетките и тъканите определя техния редокс-статус. Оценката на редокс-статуса на тъканите има голям потенциал при диагностиката на онкологични заболявания, както и перспективи при антираковата терапия и би могла значително да допринесе за планирането на подходящо лечение и за повишаване качеството на живот на пациентите. Конвенционалната терапевтична стратегия се основава на лекарства, които увеличават генерирането на ROS и индуцират апоптоза в раковите клетки. Този терапевтичен подход обаче, има сериозни недостатъци, който се изразява в проявата на различни странични ефекти в нормални (неракови) тъкани. Настоящият обзор описва основите на биологията на свободните радикали в канцерогенезата. Авторите акцентират върху различния редокс-статус, с който се характеризират нормалните и раковите клетки, което позволява използването на този показател като нов терапевтичен таргет. Авторите, също така очертават някои насоки за разработването на обещаващи терапевтични стратегии, на база на регулацията на редокс-

сигнализацията с помощта на комбинирана терапия. Обзорът е предназначен за широка читателска аудитория – от неспециалисти до изследователи в областта на биохимията на онкологичните заболявания и фармацията.

Over 50 years of experience in free radical biology and medicine shows that normal cells of healthy mammals are characterized by a low steady-state level of reactive oxygen species (ROS) and a constant (reference) level of reducing equivalents. A lasting increase of ROS above the critical level leads to permanent oxidative stress in the cells. This could cause genomic instability and mutations, which are responsible for adaptation of cells to oxidative stress and their survival in an oxidative environment. In turn, these events could provoke malignancy. It is widely accepted that the balance between ROS and reducing equivalents in cells and tissues determines their redox status. The evaluation of tissue redox status has great diagnostic potential in cancer, as well as prognostic potential for cancer therapy, and could significantly contribute to the planning of appropriate treatment and to increasing the patients' quality of life. The conventional therapeutic strategy is based on drugs that increase ROS generation and induce apoptosis in cancer cells. However, this therapeutic approach has serious disadvantages: the expression of various toxic side effects in normal (non-cancer) tissues. The current review describes the basics of free radical biology in carcinogenesis. The authors emphasize the different redox status of normal and cancer cells, which permits the use of this parameter as a new therapeutic target. The authors also outline some directions for the development of promising therapeutic strategies based on the regulation of redox signaling using combined therapy. The review is intended for a broad readership – from non-specialists to researchers in the field of cancer biochemistry and pharmacy.

**A4. Ivanova D., E. Georgieva, D. Lazarova, V. Gadjeva, R. Bakalova and Z. Zhelev - Redox-modulating and/or antioxidant properties of nitroxides – a potential reason for decreasing side-effects of cancer therapy, Trakia Journal of Sciences, 2014, 12(3), 329-337.**

Съществуващите терапевтични подходи – лъчетерапията и конвенционалната химиотерапия при онкологични заболявания, имат сериозни странични ефекти, в резултат на повишеното образуване на активни форми на кислорода и азота (ROS/RNS) в нераковите клетки и тъкани. Развитието на оксидативен стрес в нераковите тъкани е сериозен проблем при терапията на онкологични заболявания. Необходимо е да се проучи въпросът за комбинация от вещества с диференциран и синергичен ефект върху раковите и нормалните клетки: вещества с понижаващи нивата на ROS/RNS, насочени към нормални клетки и вещества, повишаващи нивата на ROS/RNS в раковите клетки. В този контекст редокс-модулаторите са едни от най-подходящите претенденти. Настоящият обзор очертава основния принцип на тази нова терапевтична стратегия, като се фокусира върху нитроксидните производни, като едни от най-обещаващите редокс-модулатори с антиоксидантна способност.

The existing therapeutic approaches – radiation therapy and conventional chemotherapy of cancer, suffer of serious side-effects as a result of increased generation of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) in non-cancer cells and tissues. Currently, the development of oxidative stress in non-cancer tissues of cancer-bearing organism is a serious problem of cancer therapy. It is necessary to ask about a combination of substances expressing a therapeutic synergism as a result of differentiated effects on cancer and normal cells: substances with increased ROS/RNS-scavenging properties, targeting normal cells and substances with increased ROS/RNS-generating properties targeting cancer cells. In this context, the redox-modulators are one of the most attractive candidates. The present review outlines the basic principle of this novel therapeutic strategy, focusing on nitroxide derivatives as one of the most promising redox-modulators with antioxidant ability.

Изготвил:.....  
/ ас. д-р Доника Иванова /