

**Резюмета на български и английски език на научните публикации
на гл. ас. д-р Людмила Людмила Димитрова**
относно участие в конкурс за заемане на академична длъжност “доцент”
по направление 4.3. Биологически науки,
за нуждите на Лаборатория “Бактериална вирулентност, резистентност и
нови антимикробни агенти”, Департамент по Инфекциозна микробиология,
Институт по микробиология “Стефан Ангелов” (ИМикБ) при
Българска Академия на Науките (БАН)

Списъкът съдържа представените 20 публикации в справката за изпълнение на допълнителните критерии за израстване на академичния състав на ИМикБ-БАН, подредени по години и квартали.

Публикации в индексирани и реферирани списания, включени по показател В.
Хабилитационен труд – научни публикации в издания, които са реферирани и
индексирани в WoS/Scopus

1. Zaharieva, M. M., **Dimitrova, L. L.**, Philipov, S., Nikolova, I., Vilhelmova, N., Grozdanov, P., Nikolova, I., Popova, M., Bankova, V., Konstantinov, S.M., Zheleva-Dimitrova, D., Najdenski, H. M. (2021). *In vitro* antineoplastic and antiviral activity and *in vivo* toxicity of *Geum urbanum* L. extracts. *Molecules*, 27(1), 245. **IF:4.927, Q1**

Abstract: This study evaluated the *in vitro* antineoplastic and antiviral potential and *in vivo* toxicity of twelve extracts with different polarity obtained from the herbaceous perennial plant *Geum urbanum* L. (Rosaceae). *In vitro* cytotoxicity was determined by ISO 10993-5/2009 on bladder cancer, (T-24 and BC-3C), liver carcinoma (HEP-G2) and normal embryonic kidney (HEK-293) cell lines. The antineoplastic activity was elucidated through assays of cell clonogenicity, apoptosis induction, nuclear factor kappa B p65 (NFκB p65) activation and total glutathione levels. Neutral red uptake study was applied for antiviral activity. The most promising *G. urbanum* extract was analyzed by UHPLC–HRMS. The acute *in vivo* toxicity analysis was carried out following OECD 423. The ethyl acetate extract of aerial parts (EtOAc-AP) exhibited the strongest antineoplastic activity on bladder cancer cell lines (IC₅₀ = 21.33–25.28 µg/mL) by inducing apoptosis and inhibiting NFκB p65 and cell clonogenicity. EtOAc and n-butanol extracts showed moderate antiviral activity against human adenovirus type 5 and human simplex virus type I. Seventy four secondary metabolites (gallic and ellagic acid derivatives, phenolic acids, flavonoids, etc.) were identified in EtOAc-AP by UHPLC–HRMS. This extract induced no signs of acute toxicity in liver and kidney specimens of H-albino mice in doses up to 210 mg/kg. In conclusion, our study contributes substantially to the detailed pharmacological characterization of *G. urbanum*, thus helping the development of health-promoting phytopreparations.

Резюме: Това проучване оценява *in vitro* антинеопластичния и антивирусния потенциал и *in vivo* токсичността на дванадесет екстракта с различна полярност, получени от

тревистото многогодишно растение *Geum urbanum* L. (Rosaceae). *In vitro* цитотоксичността е определена по ISO 10993-5/2009 върху клетъчни линии на рак на пикочния мехур (T-24 и BC-3C), чернодробен карцином (HEP-G2) и нормален ембрионален бъбрек (HEK-293). Антинеопластичната активност е изяснена чрез анализи на клетъчна клоногенност, индукция на апоптоза, активиране на ядрен фактор капа В p65 (NFκB p65) и общи нива на глутатион. За антивирусна активност е проведено изследване на поемането на неутрално червено. Най-обещаващият екстракт от *G. urbanum* е анализиран чрез UHPLC-HRMS. Анализът на острата *in vivo* токсичност е проведен съгласно OECD 423. Етилацетатният екстракт от надземни части (EtOAc-AP) показва най-силна антинеопластична активност върху клетъчни линии на рак на пикочния мехур (IC₅₀ = 21.33–25.28 µg/mL) чрез индуциране на апоптоза и инхибиране на NFκB p65 и клетъчната клоногенност. EtOAc и n-бутанолови екстракти показват умерена антивирусна активност срещу човешки аденовирус тип 5 и човешки симплекс вирус тип I. Седемдесет и четири вторични метаболита (производни на галова и елагова киселина, фенолни киселини, флавоноиди и др.) са идентифицирани в EtOAc-AP чрез UHPLC-HRMS. Този екстракт не индуцира признаци на остра токсичност в проби от черния дроб и бъбреците на Н-албинос мишки в дози до 210 mg/kg. В заключение, нашето проучване допринася съществено за подробната фармакологична характеристика на *G. urbanum*, като по този начин помага за разработването на здравословни фитопрепарати.

2. Trusheva, B., Petkov, H., Chimshirova, R., Popova, M., **Dimitrova, L.**, Zaharieva, M. M., Ilieva, Y., Vasileva, B., Tsvetkova, I., Najdenski, H., Miloshev, G., Georgieva, M., Bankova, V. (2024). Insight into the influence of natural deep eutectic solvents on the extraction of phenolic compounds from poplar type propolis: Composition and *in vitro* biological activity. *Heliyon*, 10(7), e28621. **IF:4.0, Q1**

Abstract: Natural deep eutectic solvents (NADESs) have been considered promising to replace traditional volatile and toxic organic solvents for the extraction of biologically active substances from natural sources. This work applied an efficient and ethanol-exclusion strategy for extraction of phenolic compounds from poplar type propolis using five known NADESs (lactic acid:1,2-propanediol 1:1, lactic acid:fructose 5:1, choline chloride:1,2-propanediol 1:3, choline chloride:1,2-propanediol:water 1:1:1 and betaine:malic acid:water 1:1:6). The selected NADESs' extractability was evaluated by measuring the concentrations of total phenolics and total flavones and flavonols in the propolis extracts obtained, which qualitative chemical composition was further determined in detail by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis. It demonstrated that the chemical profiles of NADES and 70% ethanolic propolis extracts are similar. To expand the knowledge about the role of the applied solvents in the poplar propolis extraction process, the *in vitro* antimicrobial, cytotoxic and genotoxic activity of both NADESs and liquid NADES extracts were evaluated. The results revealed that the use of the selected NADESs as an extraction media for phenolic compounds from poplar propolis not only delivered a good extraction yield in some cases, but generally led to the preservation of propolis extracts' biological activity and even to the

enhancement of their antimicrobial effect in comparison with the hydroethanolic one. Besides, the tested NADESs except for lactic acid: fructose and betaine:malic acid:water exerted low to negligible toxicity against normal cells treated and apart from lactic acid:fructose the remaining solvents demonstrated concentration-dependent moderate to subtle genotoxicity. There is a probability that not the supramolecular structure of the NADESs, but their components, played a key role for the observed biological effects. The present study has demonstrated an alternative approach for extracting the biologically active complex from poplar type propolis using NADESs, which could be useful for further pharmaceutical and cosmeceutical applications.

Резюме: Природните дълбоко евтектични разтворители (ПДЕР) се считат за обещаващи да заменят традиционните летливи и токсични органични разтворители за екстракция на биологично активни вещества от природни източници. В тази работа е приложена ефикасна стратегия за изключване на етанол за екстракция на фенолни съединения от прополис от тополов тип, използвайки пет известни ПДЕР (млечна киселина:1,2-пропандиол 1:1, млечна киселина:фруктоза 5:1, холин хлорид:1,2-пропандиол 1:3, холин хлорид:1,2-пропандиол:вода 1:1:1 и бетаин:ябълчена киселина:вода 1:1:6). Екстрахируемостта на избраните ПДЕР е оценена чрез измерване на концентрациите на общи феноли и общи флавонови и флавоноли в получените екстракти от прополис, чийто качествен химичен състав е допълнително определен подробно чрез газова хроматография-маспектрометрия (GC-MS). Демонстрира се, че химичните профили на ПДЕР и 70% етанолови екстракти от прополис са сходни. За да се разширят познанията за ролята на използваните разтворители в процеса на екстракция на тополов прополис, беше оценена *in vitro* антимикробната, цитотоксичната и генотоксичната активност както на ПДЕР, така и на течни ПДЕР екстракти. Резултатите показаха, че използването на избраните ПДЕР като екстракционна среда за фенолни съединения от тополов прополис не само води до добър добив на екстракция в някои случаи, но като цяло води до запазване на биологичната активност на прополисовите екстракти и дори до засилване на техния антимикробен ефект в сравнение с хидроетанолния. Освен това, тестваните ПДЕР, с изключение на млечна киселина:фруктоза и бетаин:ябълчена киселина:вода, проявяват ниска до незначителна токсичност срещу третираните нормални клетки, а освен млечна киселина:фруктоза, останалите разтворители показват зависима от концентрацията умерена до лека генотоксичност. Вероятно не супрамолекулярната структура на ПДЕР, а техните компоненти, са играли ключова роля за наблюдаваните биологични ефекти. Настоящото проучване демонстрира алтернативен подход за екстракция на биологично активния комплекс от тополов тип прополис, използвайки ПДЕР, който би могъл да бъде полезен за по-нататъшни фармацевтични и козметични приложения.

3. **Dimitrova, L., Mileva, M., Georgieva, A., Tzvetanova, E., Popova, M., Bankova,**

V., & Najdenski, H. (2025). Redox-modulating capacity and effect of ethyl acetate roots and aerial parts extracts from *Geum urbanum* L. on the phenotype inhibition of the *Pseudomonas aeruginosa* Las/RhI quorum sensing system. *Plants*, 14(2), 213. **IF:4.0, Q1**

Abstract: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen that causes nosocomial infections of the urinary tract, upper respiratory tract, gastrointestinal tract, central nervous system, etc. It is possible to develop bacteremia and sepsis in immunocompromised patients. A major problem in treatment is the development of antibiotic resistance. Therefore, new preparations of natural origin are sought, such as plant extracts, which are phytocomplexes and to which it is practically impossible to develop resistance. *Geum urbanum* L. (*Rosacea*) is a perennial herb known for many biological properties. This study aimed to investigate the redox-modulating capacity and effect of ethyl acetate (EtOAc) extracts from roots (EtOAcR) and aerial parts (EtOAcAP) of the Bulgarian plant on the phenotype inhibition of the *P. aeruginosa* Las/RhI quorum sensing (QS) system, which primarily determines drug resistance in pathogenic bacteria, including biofilm formation, motility, and pigment production. We performed QS assays to account for the effects of the two EtOAc extracts. At sub-minimal inhibitory concentrations (sub-MICs) ranging from 1.56 to 6.25 mg/mL, the biofilm formation was inhibited 85% and 84% by EtOAcR and 62% and 39% by EtOAcAP extracts, respectively. At the same sub-MICs, the pyocyanin synthesis was inhibited by 17–27% after treatment with EtOAcAP and 26–30% with EtOAcR extracts. The motility was fully inhibited at 3.12 mg/mL and 6.25 mg/mL (sub-MICs). We investigated the inhibitory potential of *lasI*, *lasR*, *rhlI*, and *rhlR* gene expression in biofilm and pyocyanin probes with the PCR method. Interestingly, the genes were inhibited by two extracts at 3.12 mg/mL and 6.25 mg/mL. Antiradical studies, assessed by DPPH, CUPRAC, and ABTS radical scavenging methods and superoxide anion inhibition showed that EtOAcAP extract has effective antioxidant capacity. These results could help in the development of new phytocomplexes that could be applied as biocontrol agents to inhibit the phenotype of the *P. aeruginosa* QS system and other antibiotic-resistant pathogens.

Резюме: *Pseudomonas aeruginosa* е опортюнистичен патоген, който причинява нозокомиални инфекции на пикочните пътища, горните дихателни пътища, стомашно-чревния тракт, централната нервна система и др. Възможно е да се развие бактериемия и сепсис при имунокомпрометирани пациенти. Основен проблем при лечението е развитието на антибиотична резистентност. Поради това се търсят нови препарати с природен произход, като растителни екстракти, които са фитокомплекси и към които е практически невъзможно да се развие резистентност. *Geum urbanum* L. (*Rosacea*) е многогодишно растение, известно с много биологични свойства. Целта на това проучване е да се изследва редокс-модулиращия капацитет и ефектът на етилацетатни (EtOAc) екстракти от корени (EtOAcR) и надземни части (EtOAcAP) на българското растение върху фенотипната инхибиция на Las/RhI кворум сенсинг системата на *P. aeruginosa*, която определя предимно лекарствената резистентност при патогенните бактерии, включително образуване на биофилм, подвижност и производство на пигменти. Проведохме QS анализи, за да отчетем ефектите на двата EtOAc екстракта.

При суб-минимални инхибиторни концентрации (суб-МИК), вариращи от 1,56 до 6,25 mg/mL, образуването на биофилм е инхибирано съответно с 85% и 84% от EtOAcR и с 62% и 39% от екстракти от EtOAcAP. При същите суб-МИК, синтезът на пиоцианин е инхибиран със 17–27% след третиране с EtOAcAP и с 26–30% с екстракти от EtOAcR. Подвижността е напълно инхибирана при 3,12 mg/mL и 6,25 mg/mL (суб-МИК). Изследвахме техния потенциал да инхибират експресията на *lasI*, *lasR*, *rhlI* и *rhlR* гени в проби от биофилм и пиоциан с PCR. Интересното е, че гените са инхибирани от двата екстракта - при 3,12 mg/mL и 6,25 mg/mL. Антирадикални изследвания, оценени чрез методи за улавяне на радикалите DPPH, CUPRAC и ABTS и инхибиране на супероксидни аниони, показват, че екстрактът от EtOAcAP има ефективен антиоксидантен капацитет. Тези резултати биха могли да помогнат за разработването на нови фитокомплекси, които биха могли да се прилагат като биоконтролни агенти за инхибиране на фенотипа на *P. aeruginosa* QS системата и други антибиотично-резистентни патогени.

4. Trusheva, B., Petkov, H., Popova, M., **Dimitrova, L.**, Zaharieva, M., Tsvetkova, I., & Bankova, V. (2019). “Green” approach to propolis extraction: Natural deep eutectic solvents. *Comptes Rendus l’Academie Bulg. Sci*, 72, 897-905. **IF:0.321, Q1**

Abstract: Finding new green solvents for extraction of bioactive natural compounds is among the first areas of research in green chemistry. Recently, a new kind of “green” solvents, the natural deep eutectic solvents (NADESs), was developed. In a particular combination and ratio natural compounds in solid state (primary metabolites) may generate a eutectic mixture and can be converted into liquids to form NADES.

In this study, we have selected five known NADESs with polarity appropriate for the extraction of the bioactive substances from poplar propolis: flavonoid aglycones, phenolic acids, and their esters, and studied the chemical composition of the obtained NADES propolis extracts, as well as their antimicrobial potential. Ultrasound extraction was applied, and the extraction yield was evaluated by measuring the percentage of extracted total phenolics, and total flavones and flavonols. The qualitative composition of the extracts was studied by GC-MS analysis. Best extraction results were achieved using citric acid – 1,2-propanediol 1:4 (CAPD), it only extracted somewhat lower amount of total flavones and flavonols than the conventional 70% ethanol. The GC-MS analysis confirmed that the major propolis constituents: pinocembrin, chrysin, galangin, phenethyl caffeate (CAPE), chemical markers of poplar type propolis and well-known bioactive compounds, are major constituents of all studied NADES extracts. Their antimicrobial activity was of the same order of magnitude as the conventional ethanol extract, the best results were obtained with CAPD.

Our results demonstrate for the first time the potential of NADESs to be used as solvents for extraction of the biologically active constituents of poplar type propolis.

Резюме: Намирането на нови зелени разтворители за екстракция на биоактивни природни съединения е сред първите области на изследвания в зелената химия. Наскоро бяха разработени нови „зелени“ разтворители, природни дълбоко евтектични

разтворители (ПДЕР). В определена комбинация и съотношение, естествените съединения в твърдо състояние (първични метаболити) могат да генерират евтектична смес и да се превърнат в течности, за да образуват ПДЕР.

В това проучване сме избрали пет известни ПДЕР с полярност, подходяща за екстракция на биологично активни вещества от тополов прополис: флавоноидни агликонни, фенолни киселини и техните естери, и сме изследвали химичния състав на получените екстракти от ПДЕР прополис, както и техния антимикробен потенциал. Приложена е ултразвукова екстракция и добивът от екстракцията е оценен чрез измерване на процента на екстрахираните общи феноли и общи флавоноли и флавоноли. Качественият състав на екстрактите е изследван чрез GC-MS анализ. Най-добри резултати при екстракцията са постигнати с лимонена киселина – 1,2-пропандиол 1:4 (CAPD), като при него са извлечени съвсем по-малко количество общи флавоноли и флавоноли в сравнение с конвенционалния 70% етанол. GC-MS анализът потвърди, че основните съставки на прополиса: пиноцембрин, хризин, галангин, фенетил кофеат (CAPE), химични маркери на прополис от тополов тип и добре познати биологично активни съединения, са основни съставки на всички изследвани ПДЕР екстракти. Тяхната антимикробна активност е от същия порядък като на конвенционалния етанолов екстракт, като най-добри резултати са получени с CAPD.

Нашите резултати за първи път демонстрират потенциала на ПДЕР да се използват като разтворители за екстракция на биологично активните съединения на прополис от тополов тип.

5. Grozdanova, T., Trusheva, B., Alipieva, K., Popova, M., **Dimitrova, L.**, Najdenski, H., ... & Bankova, V. (2020). Extracts of medicinal plants with natural deep eutectic solvents: Enhanced antimicrobial activity and low genotoxicity. *BMC chemistry*, 14(1), 73. **IF:2.61, Q3**

Abstract: Natural deep eutectic solvents (NADES) are a new alternative to toxic organic solvents. Their constituents are primary metabolites, non-toxic, biocompatible and sustainable. In this study four selected NADES were applied for the extraction of two medicinal plants: *Sideritis scardica*, and *Plantago major* as an alternative to water-alcohol mixtures, and the antimicrobial and genotoxic potential of the extracts were studied. The extraction efficiency was evaluated by measuring the extracted total phenolics, and total flavonoids. Best extraction results for total phenolics for the studied plants were obtained with choline chloride-glucose 5:2 plus 30% water; but surprisingly these extracts were inactive against all tested microorganisms. Extracts with citric acid-1,2-propanediol 1:4 and choline chloride-glycerol 1:2 showed good activity against *S. pyogenes*, *E. coli*, *S. aureus*, and *C. albicans*. Low genotoxicity and cytotoxicity were observed for all four NADES and the extracts with antimicrobial activity. Our results confirm the potential of NADESs for extraction of bioactive constituents of medicinal plants and further suggest that NADES can improve the effects of bioactive extracts. Further studies are needed to clarify the influence of the studied NADES on the bioactivity of dissolved substances, and the possibility to use such extracts in the pharmaceutical and food industry.

Резюме: Природните дълбоко евтектични разтворители (ПДЕР) са нова алтернатива на токсичните органични разтворители. Техните съставки са първични метаболити, нетоксични, биосъвместими и устойчиви. В това проучване са приложени четири избрани ПДЕР за екстракция на две лечебни растения: *Sideritis scardica* и *Plantago major*, като алтернатива на водно-алкохолните смеси, и е изследван антимикробният и генотоксичен потенциал на екстрактите. Ефективността на екстракцията е оценена чрез определяне на екстрахираните общи феноли и общи флавоноиди. Най-добри резултати при екстракцията на общи феноли от изследваните растения са получени с холин хлорид-глюкоза 5:2 плус 30% вода; но изненадващо тези екстракти са неактивни срещу всички тествани микроорганизми. Екстракти с лимонена киселина-1,2-пропандиол 1:4 и холин хлорид-глицерол 1:2 показват добра активност срещу *S. pyogenes*, *E. coli*, *S. aureus* и *C. albicans*. Наблюдавана е ниска генотоксичност и цитотоксичност и за четирите ПДЕР и екстрактите с антимикробна активност. Нашите резултати потвърждават потенциала на ПДЕР за екстракция на биологично активни вещества от лечебни растения и допълнително показват, че ПДЕР могат да подобрят ефектите на биоактивните екстракти. Необходими са допълнителни проучвания, за да се изясни влиянието на изследваните ПДЕР върху биоактивността на разтворените вещества и възможността за използване на такива екстракти във фармацевтичната и хранително-вкусовата промишленост.

6. **Dimitrova, L.**, Philipov, S., Zaharieva, M. M., Miteva-Staleva, J., Popova, M., Tserovska, L., Krumova, E., Zhelezova, G., Bankova, V., Najdenski, H. (2021). *In vivo* assessment of acute and subacute toxicity of ethyl acetate extract from aerial parts of *Geum urbanum* L. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35(1), 61-73. **IF:1.632, Q3**

Abstract: *Geum urbanum* L. is a medicinal plant used from ancient time against gastrointestinal disorders, bleeding and inflammation of mucous membranes, gums (gingivitis), etc. In our previous works, we demonstrated the antibacterial and antioxidant properties of ethyl acetate (EtOAc) extracts *in vitro*. The aim of this study was to evaluate the possibility of the EtOAc fraction from aerial parts to provoke acute and subacute toxicity by its internal daily administration (*per os*) in healthy H- albino male and female mice. We used three concentrations of treatment according to their biological activity potential of application – 20, 70 and 210 mg/kg. All animals were observed and recorded periodically for clinical signs, mortality and changes in their behavior (incl. hypo-activity, aggression, etc.). The body weight was measured at every 5 days up to the end of the experiment (a total 28 days). We studied the biochemical parameters (superoxide anion radical, hydrogen peroxide, superoxide dismutase, lipid peroxidation and damaged proteins in blood plasma and brain) and complete hematological parameters, and the histopathological findings in mouse spleens and Payer's patches. The investigated extract did not show any signs of significant acute and subacute toxicity at the highest applied test-concentration, and therefore, we encouraged its possible application as food additive for various infectious diseases.

Резюме: *Geum urbanum* L. е лечебно растение, използвано от древни времена срещу стомашно-чревни разстройства, кървене и възпаление на лигавиците, венците (гингивит) и др. В предишни наши изследвания демонстрирахме антибактериалните и антиоксидантните свойства на етилацетатните (EtOAc) екстракти *in vitro*. Целта на това проучване беше да се оцени възможността на EtOAc фракцията от надземни части да провокира остра и подостра токсичност чрез ежедневното ѝ вътрешно приложение (*per os*) при здрави мъжки и женски Н-албиноси мишки. Използвахме три концентрации на лечение според потенциала им на биологична активност на приложение - 20, 70 и 210 mg/kg. Всички животни бяха наблюдавани и записвани периодично за клинични признаци, смъртност и промени в поведението им (вкл. хипоактивност, агресия и др.). Телесното тегло беше измервано на всеки 5 дни до края на експеримента (общо 28 дни). Изследвахме биохимичните параметри (супероксиден анионен радикал, водороден пероксид, супероксид дисмутаза, липидна пероксидация и увредени протеини в кръвната плазма и мозъка) и пълните хематологични параметри, както и хистопатологичните находки в миши далак и плаки на Пайер. Изследваният екстракт не показва признаци на значителна остра и субакутна токсичност при най-високата приложена тестова концентрация и следователно насърчихме евентуалното му приложение като хранителна добавка за различни инфекциозни заболявания.

7. Mileva, M., **Dimitrova, L.**, Popova, M., Bankova, V., Krastev, D., Najdenski, H., Zhelev, Z., Aoki, I., Bakalova-Zheleva, R. (2021). Redox-modulation, suppression of "oncogenic" superoxide and induction of apoptosis in Burkitt's lymphoma cells using *Geum urbanum* L. extracts. *International Journal Bioautomation*, 25(4), 315-330. **SJR:0.24, Q3**

Abstract: Burkitt's lymphoma is a highly aggressive type of non-Hodgkin's lymphoma, linked to the Epstein-Barr virus, which induces oxidative stress and DNA damage in the infected cells. We investigated the cytotoxicity and redox-modulating ability of ethyl acetate (EtOAc) and n-butanol (n-BuOH) extracts from *Geum urbanum* L. roots and aerial parts on Burkitt's lymphoma cells (BLC), to elucidate their impact on oxidative stress and cell survival. BLC Raji was treated with EtOAc and n-BuOH extracts to analyze: cell viability; induction of apoptosis; hydroperoxides and reactive nitrogen species (RNS) by 2',7'-dichlorodihydrofluorescein assay; superoxide by dihydroethidium assay; total antioxidant capacity by TAC assay. All extracts suppressed cell growth and induce apoptosis. n-BuOH extracts possessed higher cytotoxicity and pro-apoptotic activity compared to EtOAc. The fractions decreased the hydroperoxides and RNS levels. There was no correlation between the DCF fluorescence in the treated cells and their viability ($R = -0.3722$; $p > 0.05$). Root extracts decreased the superoxide level, while the leaf extracts did not. There was a good correlation between the dihydroethidium fluorescence in the treated cells and their viability ($R = 0.9843$; $p < 0.01$). All extracts increased the TAC of BLC. *G. urbanum* extracts serve as redox-modulators and anti-inflammatory compounds, decreasing the intracellular level of "oncogenic" superoxide and cell proliferation.

Резюме: Лимфомът на Бъркит е силно агресивен тип неходжкинов лимфом, свързан с вируса на Епщайн-Бар, който индуцира оксидативен стрес и увреждане на ДНК в инфектираните клетки. Изследвахме цитотоксичността и редокс-модулиращата способност на екстракти от етилацетат (EtOAc) и n-бутанол (n-BuOH) от корени и надземни части на *Geum urbanum* L. върху лимфома на Бъркит клетки (BLC), за да изясним тяхното въздействие върху оксидативния стрес и клетъчното оцеляване. BLC Raji бяха третирани с екстракти от EtOAc и n-BuOH, за да анализираме: клетъчна жизнеспособност; индуциране на апоптоза; хидропероксиди и реактивни азотни видове (RNS) чрез 2',7'-дихлордихидрофлуоресцеинов анализ; супероксид чрез дихидроетидиев анализ; общ антиоксидантен капацитет чрез TAC анализ. Всички екстракти потискат клетъчния растеж и индуцират апоптоза. Екстрактите от n-BuOH притежават по-висока цитотоксичност и проапоптотична активност в сравнение с EtOAc. Фракциите намаляват нивата на хидропероксиди и RNS. Не е установена корелация между флуоресценцията на DCF в третираните клетки и тяхната жизнеспособност ($R = -0,3722$; $p > 0,05$). Екстрактите от корени намаляват нивото на супероксид, докато екстрактите от листа не. Наблюдава се добра корелация между флуоресценцията на дихидроетидиум в третираните клетки и тяхната жизнеспособност ($R = 0,9843$; $p < 0,01$). Всички екстракти повишават TAC на BLC. Екстрактите от *G. urbanum* служат като редокс-модулатори и противовъзпалителни съединения, намалявайки вътреклетъчното ниво на „онкогенен“ супероксид и клетъчната пролиферация.

Публикации в индексирани и реферирани списания, включени по показател Г. Научни публикации в издания, които са реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (Web of Science и Scopus), извън хабилитационния труд

1. **Dimitrova, L.,** Kaleva, M., Zaharieva, M. M., Stoykova, C., Tsvetkova, I., Angelovska, M., ... & Najdenski, H. (2021). Prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from swine faeces and lagoons in Bulgaria. *Antibiotics*, 10(8), 940. **IF:5.222, Q1**

Abstract: Antimicrobial resistance (AMR) is a worldwide health problem affecting humans, animals, and the environment within the framework of the “One Health” concept. The aim of our study was to evaluate the prevalence of pathogenic strains of the species *Escherichia coli* (*E. coli*), their AMR profile, and biofilm-forming potential. The isolated strains from three swine faeces and free lagoons (ISO 16654:2001/Amd 1:2017) were confirmed using Phoenix M50 and 16S rDNA PCR. The antibiotic sensitivity to 34 clinically applied antibiotics was determined by Phoenix M50 and the disc diffusion method, according to the protocols of the CLSI and EUCAST. We confirmed the presence of 16 *E. coli* isolates, of which 87.5% were multi-drug-resistant and 31.25% performed strong biofilms. The possibility for the carrying and transmission of antibiotic-resistance genes to quinolones (*qnr*), aminoglycosides (*aac(3)*), β -lactamase-producing plasmid genes *ampC*, and *blaSHV/blaTEM* was investigated. We

confirmed the carrying of *bla*SHV/*bla*TEM in one and *amp*C in seven isolates. The strains were negative for the virulence genes (ETEC (LT, STa, and F4), EPEC (*eae*), and STEC/VTEC (*stx* and *stx2all*)). The results should contribute to the development of effective measures for limitation and control on the use of antibiotics, which is a key point in the WHO action plan.

Резюме: Антимикробната резистентност (AMP) е световен здравен проблем, засягащ хората, животните и околната среда в рамките на концепцията „Едно здраве“. Целта на проучването ни беше да се оцени разпространението на патогенни щамове от вида *Escherichia coli* (*E. coli*), техният AMP профил и потенциал за образуване на биофилм. Изолираните щамове от три свински фецеса и лагуни (ISO 16654:2001/Amd 1:2017) бяха потвърдени с помощта на Phoenix M50 и 16S rDNA PCR. Антибиотичната чувствителност към 34 клинично прилагани антибиотика беше определена чрез Phoenix M50 и дисково-дифузионния метод, съгласно протоколите на CLSI и EUCAST. Потвърдихме наличието на 16 *E. coli* изолата, от които 87,5% бяха мултирезистентни, а 31,25% образуваха здрави биофилми. Изследвана е възможността за носене и предаване на гени за антибиотична резистентност към хинолони (*qnr*), аминогликозиди (*aac*(3)), β -лактамаза-продуциращи плазмидни гени *amp*C и *bla*SHV/*bla*TEM. Потвърдихме носителството на *bla*SHV/*bla*TEM в един и *amp*C в седем изолата. Щамовете бяха отрицателни за наличие гени за вирулентност (ETEC (LT, STa и F4), EPEC (*eae*) и STEC/VTEC (*stx* и *stx2all*)). Резултатите би трябвало да допринесат за разработването на ефективни мерки за ограничаване и контрол върху употребата на антибиотици, което е ключов момент в плана за действие на ЦЗО.

2. Ilieva, Y.*, **Dimitrova, L.***, Zaharieva, M.M., Kaleva, M., Alov, P., Tsakovska, I., Pencheva, T., Pencheva-El Tibi, I., Najdenski, H., Pajeva, I. (2021). Cytotoxicity and microbicidal activity of commonly used organic solvents a comparative study and application to a standardized extract from *Vaccinium macrocarpon*. *Toxics*, 9(5), 92-108. **IF:4.472, Q1** (*-These authors contributed equally)

Abstract: The cytotoxicity and microbicidal capacity of seven organic solvents commonly applied for studying plant extracts and bioactive compounds were systematically investigated based on international standards. Four cell lines of normal (CCL-1, HaCaT) or tumor (A-375, A-431) tissue origin, seven bacterial and one fungal strain were used. The impact of the least toxic solvents in the determination of *in vitro* cytotoxicity was evaluated using a standardized extract from *Vaccinium macrocarpon* containing 54.2% v/v proanthocyanidins (CystiCran®). The solvents ethanol, methoxyethanol and polyethylene glycol were the least cytotoxic to all cell lines, with a maximum tolerated concentration (MTC) between 1 and 2% v/v. Ethanol, methanol and polyethylene glycol were mostly suitable for antimicrobial susceptibility testing, with minimum inhibitory concentrations (MICs) $\geq$ 25% v/v. The MTC values of the solvents dimethyl sulfoxide, dimethoxyethane and dimethylformamide varied from 0.03% to 1.09% v/v. The MICs of dimethyl sulfoxide, methoxyethanol and dimethoxyethane were in the range of 3.125–25% v/v. The cytotoxic effects of CystiCran® on eukaryotic cell lines

were directly proportional to the superimposed effect of the solvents used. The results of this study can be useful for selecting the appropriate solvents for *in vitro* estimation of the cytotoxic and growth inhibitory effects of bioactive molecules in eukaryotic and prokaryotic cells.

Резюме: Цитотоксичността и микробицидният капацитет на седем органични разтворителя, често използвани за изучаване на растителни екстракти и биоактивни съединения, бяха систематично изследвани въз основа на международни стандарти. Използвани са четири клетъчни линии от нормален (CCL-1, HaCaT) или туморен (A-375, A-431) тъканен произход, седем бактериални и един гъбичен щам. Влиянието на най-малко токсичните разтворители при определяне на *in vitro* цитотоксичността беше оценено с помощта на стандартизиран екстракт от *Vaccinium macrocarpon*, съдържащ 54,2% v/v проантоцианидини (CystiCran®). Разтворителите етанол, метоксиетанол и полиетиленгликол бяха най-малко цитотоксични за всички клетъчни линии, с максимално поносима концентрация (МПК) между 1 и 2% v/v. Етанолът, метанолът и полиетиленгликолят бяха най-подходящи за тестване на антимикробна чувствителност, с минимални инхибиращи концентрации (МИК) $\geq 25\%$ v/v. Стойностите на МПК на разтворителите диметилсулфоксид, диметоксиетан и диметилформаид варираха от 0,03% до 1,09% v/v. МИК на диметилсулфоксид, метоксиетанол и диметоксиетан бяха в диапазона от 3,125–25% v/v. Цитотоксичните ефекти на CystiCran® върху еукариотните клетъчни линии бяха правопрпорционални на наложения ефект на използваните разтворители. Резултатите от това проучване могат да бъдат полезни за избор на подходящи разтворители за *in vitro* оценка на цитотоксичните и инхибиращи растежа ефекти на биоактивни молекули в еукариотни и прокариотни клетки.

3. Kabaivanova, L., Hubenov, V., **Dimitrova, L.**, Simeonov, I., Wang, H., & Petrova, P. (2022). Archaeal and bacterial content in a two-stage anaerobic system for efficient energy production from agricultural wastes. *Molecules*, 27(5), 1512. **IF:4.927, Q1**

Abstract: Anaerobic digestion (AD) is a microbially-driven process enabling energy production. Microorganisms are the core of anaerobic digesters and play an important role in the succession of hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis, and methanogenesis processes. The diversity of participating microbial communities can provide new information on digester performance for biomass valorization and biofuel production. In this study anaerobic systems were used, operating under mesophilic conditions that realized biodegradation processes of waste wheat straw pretreated with NaOH—a renewable source for hydrogen and methane production. These processes could be managed and optimized for hydrogen and methane separately but combining them in a two-stage system can lead to higher yields and a positive energy balance. The aim of the study was to depict a process of biohydrogen production from lignocellulosic waste followed by a second one leading to the production of biomethane. Archaeal and bacterial consortia in a two-stage system operating with wheat straw were identified for the first time and the role of the most important representatives was elucidated.

The mixed cultures were identified by the molecular-biological methods of metagenomics. The results showed that biohydrogen generation is most probably due to the presence of *Proteiniphilum saccharofermentans*, which was 28.2% to 45.4% of the microbial community in the first and the second bioreactor, respectively. Archaeal representatives belonging to *Methanobacterium formicum* (0.71% of the community), *Methanosarcina spelaei* (0.03%), *Methanotherix soehngeni* (0.012%), and *Methanobacterium beijingense* (0.01%) were proven in the methane-generating reactor. The correlation between substrate degradation and biogas accumulation was calculated, together with the profile of fatty acids as intermediates produced during the processes. The hydrogen concentration in the biogas reached 14.43%, and the Methane concentration was 69%. Calculations of the energy yield during the two-stage process showed 1195.89 kWh·t⁻¹ compared to a 361.62 kWh·t⁻¹ cumulative yield of energy carrier for a one-stage process.

Резюме: Анаеробното разграждане (АР) е микробно задвижван процес, който позволява производството на енергия. Микроорганизмите са в основата на анаеробните дигестори и играят важна роля в последователността на процесите на хидролиза, ацидогенеза, ацетогенеза и метаногенеза. Разнообразието от участващи микробни съобщества може да предостави нова информация за работата на дигесторите за оползотворяване на биомаса и производство на биогорива. В това проучване са използвани анаеробни системи, работещи при мезофилни условия, които реализират процеси на биоразграждане на отпадъчна пшенична слама, предварително обработена с NaOH - възобновяем източник за производство на водород и метан. Тези процеси могат да бъдат управлявани и оптимизирани за водород и метан поотделно, но комбинирането им в двустепенна система може да доведе до по-високи добиви и положителен енергиен баланс. Целта на изследването е да се изобрази процес на производство на биоводород от лигноцелулозни отпадъци, последван от втори, водещ до производството на биометан. За първи път са идентифицирани археални и бактериални консорциуми в двустепенна система, работеща с пшенична слама, и е изяснена ролята на най-важните представители. Смесените култури бяха идентифицирани чрез молекулярно-биологичните методи на метагеномиката. Резултатите показаха, че генерирането на биоводород най-вероятно се дължи на наличието на *Proteiniphilum saccharofermentans*, който представлява съответно 28,2% до 45,4% от микробната общност в първия и втория биореактор. В реактора, генериращ метан, бяха доказани археални представители, принадлежащи към *Methanobacterium formicum* (0,71% от общността), *Methanosarcina spelaei* (0,03%), *Methanotherix soehngeni* (0,012%) и *Methanobacterium beijingense* (0,01%). Изчислена е корелацията между разграждането на субстрата и натрупването на биогаз, заедно с профила на мастни киселини като междинни продукти, получени по време на процесите. Концентрацията на водород в биогаза достигна 14,43%, а концентрацията на метан беше 69%. Изчисленията на енергийния добив по време на двуетапния процес показват 1195,89 kWh·t⁻¹ в сравнение с кумулативен добив на енергиен носител от 361,62 kWh·t⁻¹ за едноетапен процес.

4. Mantareva, V. N., Kussovski, V., Orozova, P., **Dimitrova, L.**, Kulu, I., Angelov, I., ... & Najdenski, H. (2022). Photodynamic inactivation of antibiotic-resistant and sensitive *Aeromonas hydrophila* with Peripheral Pd (II)-vs. Zn (II)-Phthalocyanines. *Biomedicines*, 10(2), 384. **IF:6.081, Q1**

Abstract: The antimicrobial multidrug resistance (AMR) of pathogenic bacteria towards currently used antibiotics has a remarkable impact on the quality and prolongation of human lives. An effective strategy to fight AMR is the method PhotoDynamic Therapy (PDT). PDT is based on a joint action of a photosensitizer, oxygen, and light within a specific spectrum. This results in the generation of singlet oxygen and other reactive oxygen species that can inactivate the pathogenic cells without further regrowth. This study presents the efficacy of a new Pd(II)- versus Zn(II)-phthalocyanine complexes with peripheral positions of methylpyridiloxy substitution groups (pPdPc and ZnPcMe) towards Gram-negative bacteria *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*). Zn(II)-phthalocyanine, ZnPcMe was used as a reference compound for *in vitro* studies, because it is well-known with a high photodynamic inactivation ability for different pathogenic microorganisms. The studied new isolates of *A. hydrophila* were antibiotic-resistant (R) and sensitive (S) strains. The photoinactivation results showed a full effect with 8 μ M pPdPc for S strain and with 5 μ M ZnPcMe for both R and S strains. Comparison between both new isolates of *A. hydrophila* (S and R) suggests that the uptakes and more likely photoinactivation efficacy of the applied phthalocyanines are independent of the drug sensitivity of the studied strains.

Резюме: Множественната резистентност на патогенните бактерии към използваните в момента антибиотици има забележително въздействие върху качеството и удължаването на човешкия живот. Ефективна стратегия за борба с множествената резистентност е методът Фотодинамична терапия (ФДТ). ФДТ се основава на съвместно действие на фотосенсибилизатор, кислород и светлина в рамките на специфичен спектър. Това води до генериране на синглетен кислород и други реактивни кислородни видове, които могат да инактивират патогенните клетки без по-нататъшен растеж. Това проучване представя ефикасността на нови Pd(II)- срещу Zn(II)-фталочианинови комплекси с периферни позиции на метилпиридилокси заместителни групи (pPdPc и ZnPcMe) срещу Грам-отрицателни бактерии *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*). Zn(II)-фталочианин, ZnPcMe, е използван като референтно съединение за *in vitro* изследвания, тъй като е добре известен с високата си фотодинамична инактивираща способност срещу различни патогенни микроорганизми. Изследваните нови изолати на *A. hydrophila* са резистентни (R) и чувствителни (S) към антибиотици щамове. Резултатите от фотоинактивацията показаха пълен ефект с 8 μ M pPdPc за S щам и с 5 μ M ZnPcMe както за R, така и за S щамове. Сравнението между двата нови изолати на *A. hydrophila* (S и R) предполага, че поглъщането и по-вероятната ефикасност на фотоинактивацията на приложените фталочианини са независими от лекарствената чувствителност на изследваните щамове.

5. Trochopoulos, A. G., Ilieva, Y., Kroumov, A. D., **Dimitrova, L. L.**, Pencheva-El Tibi, I., Philipov, S., ... & Zaharieva, M.M. (2022). Micellar curcumin substantially increases the antineoplastic activity of the alkylphosphocholine erufosine against TWIST1 positive cutaneous T cell lymphoma cell lines. *Pharmaceutics*, 14(12), 2688. IF:6.525, Q1

Abstract: Cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) is a rare form of cancer with local as well as systemic manifestations. Concomitant bacterial infections increase morbidity and mortality rates due to impaired skin barrier and immune deficiency. In the current study, we demonstrated that the *in vitro* anti-lymphoma potential of erufosine is diminished by TWIST1 expression and micellar curcumin substantially increases its antineoplastic activity. Pharmacokinetic analysis showed that the micellar curcumin (MCRM) used in our study was characterized by low zeta potential, slow release of curcumin, and fast cell membrane penetration. The combination ratio 1:4 [erufosine:MCRM] achieved strong synergism by inhibiting cell proliferation and clonogenicity. The combined antiproliferative effects were calculated using the symbolic mathematical software MAPLE 15. The synergistic combination strongly decreased the expression of TWIST1 and protein kinase B/Akt as proven by western blotting. Significant reductions in NF- κ B activation, induction of apoptosis, and altered glutathione levels were demonstrated by corresponding assays. In addition, the synergistic combination enhanced the anti-staphylococcal activity and prevented biofilm formation, as shown by crystal violet staining. Taken together, the above results show that the development of nanotechnological treatment modalities for CTCL, based on rational drug combinations exhibiting parallel antineoplastic and antibacterial effects, may prove efficacious.

Резюме: Кожният Т-клетъчен лимфом (CTCL) е рядка форма на рак както с локални, така и със системни прояви. Съпътстващите бактериални инфекции увеличават заболяемостта и смъртността поради нарушена кожна бариера и имунен дефицит. В настоящото проучване демонстрирахме, че *in vitro* антилимфомният потенциал на еруфозин се намалява от експресията на TWIST1, а мицеларният куркумин значително увеличава неговата антинеопластична активност. Фармакокинетичният анализ показва, че мицеларният куркумин (MCRM), използван в нашето проучване, се характеризира с нисък зета потенциал, бавно освобождаване на куркумин и бързо проникване през клетъчната мембрана. Съотношението на комбинацията 1:4 [еруфозин:MCRM] постига силен синергизъм чрез инхибиране на клетъчната пролиферация и клоногенност. Комбинираните антипролиферативни ефекти са изчислени с помощта на математическия софтуер MAPLE 15. Синергичната комбинация силно намалява експресията на TWIST1 и протеин киназа B/Akt, както е доказано чрез имуноблот. Значително намаляване на активирането на NF- κ B, индуцирането на апоптоза и променените нива на глутатион са демонстрирани чрез съответни анализи. В допълнение, синергичната комбинация засили антистафилококовата активност и предотврати образуването на биофилм, както е показано чрез оцветяване с кристал виолет. Вzeti заедно, горните резултати показват, че разработването на нанотехнологични методи за лечение на CTCL, базирани на рационални лекарствени

комбинации, проявяващи паралелни антинеопластични и антибактериални ефекти, може да се окаже ефикасно.

6. Ilieva, Y.*, **Dimitrova, L.***, Georgieva, A., Vilhelmova-Ilieva, N., Zaharieva, M. M., Kokanova-Nedialkova, Z., Dobрева, A., Paraskev, N., Kussovski, V., Najdenski, H, Mileva, M. (2022). In vitro study of the biological potential of wastewater obtained after the distillation of four Bulgarian oil-bearing roses. Plants, 11(8), 1073. **IF:4.658, Q1**
(* - These authors contributed equally)

Abstract: The wastewater after rose oil distillation is usually discharged into the drainage systems and it represents a serious environmental problem. While being rich in polyphenols, which have beneficial biological activity and application in the pharmaceutical industry, limited research has been carried out about the biological activity of the specific wastewaters *per se*. Wastewaters after distillation of the four Bulgarian oil-bearing roses *Rosa damascena* Mill., *R. alba* L., *R. centifolia* L., and *R. gallica* L. exerted significant antioxidant activity and good antiherpes simplex virus type-1 (HSV-1) activity while maintaining a good toxicological safety profile (low cytotoxic effect) towards normal cell lines. More precisely, the non-tumorigenic cells were a human (HEK-293 embryonic kidney cells) and a mouse cell line (CCL-1 fibroblasts, which are recommended as a standard for cytotoxicity evaluation in Annex C of ISO 10993-5). The concentrations that achieved antioxidant and radical scavenging effects (0.04–0.92% v/v) were much lower than most of the maximum tolerated concentrations for the tissue culture cells (0.2–3.4% v/v). The wastewaters had a weak antiproliferative effect against *Staphylococcus aureus*. None of the wastewaters had activity against Gram-negative bacteria or a bactericidal or antifungal effect. We can conclude that these four species, which are the most preferred species worldwide for producing high-quality rose oil, have the potential to be developed as promising antioxidant and antiherpesvirus nutraceuticals.

Резюме: Отпадъчните води след дестилация на розово масло обикновено се изпускат в дренажните системи и представляват сериозен екологичен проблем. Въпреки че сами по себе си отпадъчните води са богати на полифеноли, които имат полезна биологична активност и приложение във фармацевтичната индустрия, са проведени малко на брой изследвания относно тяхната биологична активност. Отпадъчните води след дестилация на четирите български маслодайни рози *Rosa damascena* Mill., *R. alba* L., *R. centifolia* L. и *R. gallica* L. проявяват значителна антиоксидантна активност и добра анти-херпес вирусна (HSV-1) активност, като същевременно поддържат добър токсикологичен профил на безопасност (нисък цитотоксичен ефект) спрямо нормалните клетъчни линии. По-точно, нетуморогенните клетки са човешка (HEK-293 ембрионални бъбречни клетки) и миша (CCL-1 фибробласти, които се препоръчват като стандарт за оценка на цитотоксичността в Приложение В на ISO 10993-5) клетъчни линии. Концентрациите, които постигнаха антиоксидантен и антирадикален ефект (0.04–0.92% v/v), бяха много по-ниски от повечето максимално поносими концентрации за клетките на тъканните култури (0.2–3.4% v/v). Отпадъчните води

имаха слаб антипролиферативен ефект срещу *Staphylococcus aureus*. Нито една от отпадъчните води нямаше активност срещу Грам-отрицателните бактерии, нито бактерициден или противогъбичен ефект. Можем да заключим, че тези четири вида, които са най-предпочитаните видове в световен мащаб за производство на висококачествено розово масло, имат потенциал да бъдат разработени като обещаващи антиоксидантни и анти-херпес вирусни нутрицевтици.

7. Angelovska, M., Zaharieva, M. M., **Dimitrova, L. L.**, Dimova, T., Gotova, I., Urshev, Z., ... & Najdenski, H. (2023). Prevalence, genetic homogeneity, and antibiotic resistance of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains isolated from slaughtered pigs in Bulgaria. *Antibiotics*, 12(4), 716. **IF:5.222, Q1**

Abstract: Yersiniosis is the third most commonly reported foodborne zoonosis in the European Union. Here, we evaluated the prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* among healthy pigs (as a major reservoir) in a slaughterhouse in Bulgaria. A total of 790 tonsils and feces from 601 pigs were examined. Isolation and pathogenicity characterization was carried out by the ISO 10273:2003 protocol and Polymerase Chain Reaction (PCR), detecting the 16S rRNA gene, attachment and invasion locus (*ail*), *Yersinia* heat-stable enterotoxin (*ystA*), and *Yersinia* adhesion (*yadA*) genes. Genetic diversity was assessed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and antimicrobial resistance by the standard disk diffusion method. Of all the pigs tested, 6.7% were positive for *Y. enterocolitica*. All isolates belonged to *Y. enterocolitica* bioserotype 4/O:3. *ail*, and *ystA* genes were detected in all positive strains (n = 43), while the plasmid *Yersinia* virulence plasmid (pYV) was detected in 41. High homogeneity was observed among the strains, with all strains susceptible to ceftriaxone, amikacin and ciprofloxacin, and resistant to ampicillin. In conclusion, a low prevalence of *Y. enterocolitica* 4/O:3 was found in healthy pigs slaughtered in Bulgaria, not underestimating possible contamination of pork as a potential risk to consumer health.

Резюме: Йерсиниозата е третата най-често съобщавана зооноза, предавана чрез храна, в Европейския съюз. В настоящото изследване е оценено разпространението на патогенната *Yersinia enterocolitica* сред здрави прасета (като основен резервоар) в кланица в България. Изследвани са общо 790 тонзили и фецеси от 601 прасета. Изолирането и характеризирането на патогенността са извършени по протокола ISO 10273:2003 и полимеразна верижна реакция (PCR), като са открити генът 16S rRNA, locus за прикрепване и инвазия (*ail*), гените за термостабилен ентеротоксин на *Yersinia* (*ystA*) и гените за адхезия на *Yersinia* (*yadA*). Генетичното разнообразие е оценено чрез пулсова гел електрофореза (PFGE), а антимикробната резистентност - чрез стандартния дисково-дифузионен метод. От всички тествани прасета 6.7% са положителни за *Y. enterocolitica*. Всички изолати принадлежат към биосеротип 4/O:3 на *Y. enterocolitica*. Гените *ail* и *ystA* бяха открити във всички положителни щамове (n = 43), докато плазмидът на вирулентността на *Yersinia* (pYV) беше открит в 41. Наблюдавана е висока хомогенност сред щамовете, като всички щамове са

чувствителни към цефтриаксон, амикацин и ципрофлоксацин и резистентни към ампицилин. В заключение, ниска разпространеност на *Y. enterocolitica* 4/O:3 е установена при здрави прасета, заклани в България, което не подценява евентуалното замърсяване на свинското месо като потенциален риск за здравето на потребителите.

8. Mileva, M., Ilieva, Y., Jovtchev, G., Gateva, S., Zaharieva, M. M., Georgieva, A., **Dimitrova, L.**, Dobрева, A., Angelova, Ts., Vilhelmova-Ilieva, N., Valcheva, V. & Najdenski, H. (2021). Rose flowers—A delicate perfume or a natural healer?. *Biomolecules*, 11(1), 127. **IF:4.694, Q1**

Abstract: Plants from the *Rosacea* family are rich in natural molecules with beneficial biological properties, and they are widely appreciated and used in the food industry, perfumery, and cosmetics. In this review, we are considering *Rosa damascena* Mill., *Rosa alba* L., *Rosa centifolia* L., and *Rosa gallica* L. as raw materials important for producing commercial products, analyzing and comparing the main biological activities of their essential oils, hydrolates, and extracts. A literature search was performed to find materials describing (i) botanical characteristics; (ii) the phytochemical profile; and (iii) biological properties of the essential oil and extracts of these so called “old roses” that are cultivated in Bulgaria, Turkey, India, and the Middle East. The information used is from databases PubMed, Science Direct, and Google Scholar. Roses have beneficial healing properties due to their richness of beneficial components, the secondary metabolites as flavonoids (e.g., flavones, flavonols, anthocyanins), fragrant components (essential oils, e.g., monoterpenes, sesquiterpenes), and hydrolysable and condensed tannins. Rose essential oils and extracts with their therapeutic properties—as respiratory antiseptics, anti-inflammatories, mucolytics, expectorants, decongestants, and antioxidants—are able to act as symptomatic prophylactics and drugs, and in this way alleviate dramatic sufferings during severe diseases.

Резюме: Растенията от семейство *Rosacea* са богати на естествени молекули с полезни биологични свойства и са широко ценени и използвани в хранително-вкусовата промишленост, парфюмерията и козметиката. В този обзор разглеждаме *Rosa damascena* Mill., *Rosa alba* L., *Rosa centifolia* L. и *Rosa gallica* L. като суровини, важни за производството на търговски продукти, анализирайки и сравнявайки основните биологични активности на техните етерични масла, хидролати и екстракти. Извършена е литературна справка, за да се намерят материали, описващи (i) ботанически характеристики; (ii) фитохимичен профил; и (iii) биологични свойства на етерично-маслените екстракти от тези така наречени „стари рози“, които се култивират в България, Турция, Индия и Близкия изток. Използваната информация е от бази данни PubMed, Science Direct и Google Scholar. Розите имат благоприятни лечебни свойства поради богатството си от полезни компоненти, вторичните метаболити като флавоноиди (напр. флаволи, флавоноли, антоцианини), ароматните компоненти (етерични масла, напр. монотерпени, сескитерпени) и хидролизуеми и кондензирани танини. Етеричните масла и екстракти от роза с техните терапевтични свойства – като респираторни антисептици, противовъзпалителни средства, муколитици, отхрачващи,

деконгестанти и антиоксиданти – са способни да действат като симптоматични профилактични средства и лекарства и по този начин да облекчат страданията по време на тежки заболявания.

9. Kaleva, M. D., Ilieva, Y., Zaharieva, M. M., **Dimitrova, L.**, Kim, T. C., Tsvetkova, I., ... & Najdenski, H. (2023). Antimicrobial resistance and biofilm formation of *Escherichia coli* isolated from pig farms and surroundings in Bulgaria. *Microorganisms*, 11(8), 1909. **IF:4.5, Q2**

Abstract: *Escherichia coli* (*E. coli*) is a ubiquitous microorganism with pathogenic and saprophytic clones. The objective of this study was to evaluate the presence, virulence, antibiotic resistance and biofilm formation of *E. coli* in three industrial farms in Bulgaria, as well as their adjacent sites related to the utilization of manure (feces, wastewater in a separator, lagoons, means of transport, and soils). The isolation of single bacterial cultures was performed via standard procedures with modifications, and *E. coli* isolates were identified via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and polymerase chain reaction (PCR). The disk diffusion method was used to assess antimicrobial resistance, and PCR was used to detect genes for antibiotic resistance (GAR) (*qnr*, *aac*(3), *ampC*, *bla*SHV/*bla*TEM and *erm*) and virulence genes (*stx*, *stx2all*, LT, STa, F4 and *eae*). The protocol of Stepanović was utilized to measure the biofilm formation of the isolates. A total of 84 isolates from different samples ($n = 53$) were identified as *E. coli*. Almost all demonstrated antimicrobial resistance, and most of them demonstrated resistance to multiple antibiotics from different classes. No virulence genes coding the Shiga toxin or enterotoxins or those associated with enteropathogenicity were detected. No GAR from those tested for quinolones, aminoglycosides and macrolides were found. However, all isolates that were resistant to a penicillin-class antibiotic (56) had β -lactamase-producing plasmid genes. All of them had *ampC*, and 34 of them had *bla*TEM. A total of 14 isolates formed strongly adherent biofilms. These results in a country where the use of antibiotics for growth promotion and prophylaxis in farms is highly restricted corroborate that the global implemented policy on antibiotics in human medicine and in animal husbandry needs revision.

Резюме: *Escherichia coli* (*E. coli*) е широко разпространен микроорганизъм с патогенни и сапрофитни клонове. Целта на това проучване беше да се оцени наличието, вирулентността, антибиотичната резистентност и образуването на биофилм от *E. coli* в три индустриални ферми в България, както и в съседни на тях обекти, свързани с оползотворяването на оборски тор (фецеси, отпадъчни води в сепаратор, лагуни, транспортни средства и почви). Изолирането на единични бактериални култури беше извършено чрез стандартни процедури с модификации, а изолатите на *E. coli* бяха идентифицирани чрез матрично-асистирана лазерна десорбция/йонизация с време на полет (MALDI-TOF-MS) и полимеразна верижна реакция (PCR). За оценка на антимикробната резистентност беше използван дисково-дифузионен метод, а PCR беше използвана за откриване на гени за антибиотична резистентност (ГАР) (*qnr*, *aac*(3),

ampC, *blaSHV/blaTEM* и *erm*) и гени за вирулентност (*stx*, *stx2all*, LT, STa, F4 и *eae*). За измерване на образуването на биофилм на изолатите беше използван протоколът на Степанович. Общо 84 изолата от различни проби ($n = 53$) бяха идентифицирани като *E. coli*. Почти всички бяха резистентни, а повечето от тях показаха множествена лекарствена резистентност. Не бяха открити гени за вирулентност, кодиращи Шига токсин или ентеротоксини, или такива, свързани с ентеропатогенност. Не бяха открити ГАР от тестваните за хинолони, аминогликозиди и макролиди. Въпреки това, всички изолата, които бяха резистентни към антибиотик от клас пеницилин (56), имаха плазмидни гени, продуциращи β -лактамаза. Всички те имаха *ampC*, а 34 от тях - *blaTEM*. Общо 14 изолата образуваха силно прилепнали биофилми. Тези резултати в страна, където употребата на антибиотици за стимулиране на растежа и профилактика във фермите е силно ограничена, потвърждават, че глобално прилаганата политика относно антибиотиците в хуманната медицина и животновъдството се нуждае от преразглеждане.

10. **Dimitrova, L.,** Ilieva, Y., Gouliamova, D., Kussovski, V., Hubenov, V., Georgiev, Y., ... & Najdenski, H. (2025). Isolation, enrichment and analysis of aerobic, anaerobic, pathogen-free and non-resistant cellulose-degrading microbial populations from methanogenic bioreactor. *Genes*, 16(5), 551. **IF:2.8, Q2**

Abstract: Background: Nowadays, the microbial degradation of cellulose represents a new perspective for reducing cellulose waste from industry and households and at the same time obtaining energy sources. Methods: We isolated and enriched two aerobic (at 37 °C and 50 °C) and one anaerobic microbial consortium from an anaerobic bioreactor for biogas production by continuous subculturing on peptone cellulose solution (PCS) medium supplemented with 0.3% treated or untreated Whatman filter paper under static conditions. Samples were taken every 7 days until day 21 to determine the percentage of cellulose biodegradation. We determined the antimicrobial resistance of aerobic and anaerobic consortia and some single colonies by disc diffusion method, against 42 clinically applied antibiotics. PCR analyses were performed to search for the presence of eight genes for cellulolytic activity and nine genes for antibiotic resistance. By metagenomics analysis, the bacterial and fungal genus distributions in the studied populations were determined. Results: Aerobes cultured at 50 °C degraded cellulose to the greatest extent (47%), followed by anaerobes (24–38%) and aerobes (8%) cultured at 37 °C. The bacterial sequence analysis showed that the dominant phyla are *Bacillota* and *Bacteroidetes* and genera - *Paraclostridium*, *Defluvitalea*, *Anaerobacillus*, *Acetivibrio*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Romboutsia*, *Terrisporobacter*, *Clostridium*, *Sporanaerobacter*, *Lentimicrobium*, etc. in a different ratio depending on the cultivation conditions and the stage of the process. Some of these representatives are cellulolytic and hemicellulolytic microorganisms. We performed lyophilization and proved that it is suitable for long-term storage of the most active consortium, which degrades even after the 10th re-inoculation for a period of one year. We proved the presence of *ssrA*, *ssrA* BS and *blaTEM* genes. Conclusions: Our findings

demonstrated the potential utility of the microbial consortium of anaerobes in the degradation of waste lignocellulose biomass.

Резюме: Въведение: В днешно време микробното разграждане на целулозата представлява нова перспектива за намаляване на целулозните отпадъци от промишлеността и домакинствата и същевременно служи за получаване на енергийни източници. Методи: Изолирахме и набогатихме два аеробни (при 37 °C и 50 °C) и един анаеробен микробен консорциум от анаеробен биореактор за производство на биогаз чрез непрекъснато субкултивиране върху среда, съдържаща разтвор от пептон и целулоза (PCS), допълнена с 0.3% третирана или нетретирана Whatman филтърна хартия при статични условия. Проби бяха вземани на всеки 7 дни до 21-ия ден, за да се определи процентът на биоразграждане на целулозата. Определихме антимикробната резистентност на аеробни и анаеробни консорциуми и някои единични колонии чрез дисково-дифузионен метод спрямо 42 клинично прилагани антибиотика. Проведени бяха PCR анализи за търсене на наличието на осем гена за целулолитична активност и девет гена за антибиотична резистентност. Чрез метагеномен анализ беше определено родовото разпределение на бактериалните и гъбични представители в изследваните популации. Резултати: Аеробите, култивирани при 50°C, разграждат целулозата в най-голяма степен (47%), следвани от анаеробите (24–38%) и аеробите (8%), култивирани при 37°C. Бактериалният секвенционен анализ показва, че доминиращите типове са *Bacillota* и *Bacteroidetes* и родове - *Paraclostridium*, *Deffluvitalea*, *Anaerobacillus*, *Acetivibrio*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Romboutsia*, *Terrisporobacter*, *Clostridium*, *Sporanaerobacter*, *Lentimicrobium* и др. в различно съотношение в зависимост от условията на култивиране и етапа на процеса. Някои от тези представители са целулолитични и хемицелулолитични микроорганизми. Извършихме лиофилизация и доказахме, че е подходящ метод за дългосрочно съхранение на най-активния консорциум, който разгражда дори след 10-тото ре-култивиране за период от една година. Доказахме наличието на *ssrA*, *ssrA BS* и *blaTEM* гените. Заклучение: Нашите открития демонстрират възможността да се използва анаеробния микробния консорциум за разграждане на отпадъчна лигноцелулозна биомаса.

11. Ilieva, Y., Zaharieva, M. M., **Dimitrova, L.**, Kaleva, M. D., Jordanova, J., Dimitrova, M., ... & Najdenski, H. (2023). Preliminary data on *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, and other bacteria, as well as absent african swine fever virus in the gut microbiota of wild mice and voles from Bulgaria. *Microbiology research*, 14(4), 1788-1819. **IF:1.5, Q3**

Abstract: Small mammals are bioindicator organisms, and, through their gut microbiota (GM), could be carriers of pathogens and resistant bacteria. Also, wild GM composition has been suggested to have large implications for conservation efforts. Seventeen bacterial species were obtained from intestinal samples of Bulgarian yellow-necked mice (*Apodemus flavicollis*) and bank voles (*Myodes glareolus*) via classic microbiological cultivation and biochemical identification. Twelve Gram-negative—*Escherichia coli*, *Yersinia*

enterocolitica, *Yersinia kristensenii*, *Hafnia alvei*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Serratia proteamaculans*, *Pseudoscherichia vulneris*, *Klebsiella pneumoniae* ssp. *ozaenae*, *Enterobacter cloacea*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas fluorescens* group—and five Gram-positive bacteria, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Bacillus thuringiensis*, and *Lysinibacillus sphaericus*, were discovered. Enterobacteriaceae was the most abundant family. The isolates belonged to one of the major reported taxa in rodents, Firmicutes (the Gram-positive species) and to the less abundant, but still among the first, phyla, Proteobacteria (the Gram-negative strains). We did not find any members of the other major phylum, Bacteroidetes, likely due to lack of metagenomic techniques. *E. coli* and *Y. enterocolitica* were confirmed with polymerase chain reaction. Almost all strains had pathogenic potential, but the good condition of the test animals suggests their commensal role. The *Y. enterocolitica* strains did not have the *ail* pathogenicity gene. There was high prevalence of multi-drug resistance (MDR), but for the expected species with high level of intrinsic resistance, such as the enterococci and *S. marcescens*. *E. coli* and some other species had very low antimicrobial resistance (AMR), in line with other studies of wild rodents. Many of the strains had biotechnological potential; e.g., *B. thuringiensis* is the most used biological insecticide, with its proteins incorporated into the Bt genetically modified maize. The GM of the tested wild mice and voles from Bulgaria proved to be a source of bacterial diversity; many of the strains were promising in terms of biotechnology, and, in addition, the samples did not contain the African swine fever virus.

Резюме: Дребните бозайници са биоиндикаторни организми и чрез чревната си микробиота (ЧМ) биха могли да бъдат носители на патогени и резистентни бактерии. Освен това се предполага, че съставът на дивия ЧМ има голямо значение за опазването. Седемнадесет бактериални вида бяха получени от чревни проби на български жълтоврати мишки (*Apodemus flavicollis*) и рижи полевки (*Myodes glareolus*) чрез класическо микробиологично култивиране и биохимична идентификация. Бяха доказани дванадесет Грам-отрицателни - *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia kristensenii*, *Hafnia alvei*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Serratia proteamaculans*, *Pseudoscherichia vulneris*, *Klebsiella pneumoniae* ssp. *ozaenae*, *Enterobacter cloacea*, *Pantoea agglomerans*, групата *Pseudomonas fluorescens* - и пет Грам-положителни бактерии, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Bacillus thuringiensis* и *Lysinibacillus sphaericus*. Enterobacteriaceae беше най-разпространеното семейство. Изолатите принадлежаха към един от основните докладвани таксони при гризачи, Firmicutes (Грам-положителни видове), и към по-малко разпространения, но все пак сред първите, тип, Proteobacteria (Грам-отрицателни щамове). Не открихме никакви членове на другия основен тип, Bacteroidetes, вероятно поради липса на метагеномни техники. *E. coli* и *Y. enterocolitica* бяха потвърдени с полимеразна верижна реакция. Почти всички щамове имаха патогенен потенциал, но доброто състояние на тестваните животни предполага тяхната коменсална роля. Щамове на *Y. enterocolitica* не притежаваха гена за патогенност. Наблюдавана е висока честота на множествена лекарствена резистентност (MDR), но за очакваните видове с високо ниво на присъща резистентност, като ентéroкоките и *S. marcescens*. *E.*

coli и някои други видове имаха много ниска антимикробна резистентност (AMR), в съответствие с други проучвания на диви гризачи. Много от щамовете имат биотехнологичен потенциал; например *B. thuringiensis* е най-използваният биологичен инсектицид, чиито протеини са включени в генетично модифицираната царевица. ЧМ на тестваните диви мишки и полевки от България се оказа източник на бактериално разнообразие; много от щамовете са обещаващи от гледна точка на биотехнологиите и освен това пробите не съдържат вируса на африканската чума по свинете.

12. Zaharieva, M. M., Trochopoulos, A., **Dimitrova, L.**, Berger, M. R., Najdenski, H., Konstantinov, S., & Kroumov, A. D. (2018). New insights in Routine procedure for mathematical evaluation of in vitro cytotoxicity data from cancer cell lines. *International Journal Bioautomation*, 22(2), 87. **SJR:0.231, Q4**

Abstract: In oncopharmacology, the common procedure to evaluate median-effect concentrations (IC_{50}) on experimental data is based on the use of well-established kinetic models representing inhibition effects of drugs on human cancer cell lines. Several widespread software programs, such as GraphPad Prism and CompuSyn offer possibilities for calculation of IC_{50} through the model of Chou. In recent study, we analyzed the results from those two software programs and compared them with the non-linear programming procedure written by us in the MAPLE symbolic software. The last evaluated IC_{50} more precisely and the correlation coefficient R value was better in all trails. We demonstrated the efficiency of non-linear programming procedures in examples of two cancer cell lines treated with three different drugs. The response surface analysis showed the potential of the applied kinetic model. As a result, we were able to define better the IC_{50} values and to use them in planning further experiments in human cancer cell lines related to single drug influence and drug-drug interference.

Резюме: В онкофармакологията, общата процедура за оценка на средните ефективни концентрации (IC_{50}) върху експериментални данни се основава на използването на добре установени кинетични модели, представляващи инхибиторните ефекти на лекарствата върху човешки ракови клетъчни линии. Няколко широко разпространени софтуерни програми, като GraphPad Prism и CompuSyn, предлагат възможности за изчисляване на IC_{50} чрез модела на Chou. В скорошно проучване анализирахме резултатите от тези две софтуерни програми и ги сравнихме с процедурата за нелинейно програмиране, написана от нас в символния софтуер MAPLE. Последния оцени IC_{50} по-точно и стойността на R коефициента на корелация беше по-добра във всички опити. Демонстрирахме ефективността на процедурите за нелинейно програмиране в примери за две ракови клетъчни линии, третирани с три различни лекарства. Анализът на повърхността на отговора показва потенциала на приложения кинетичен модел. В резултат на това успяхме да дефинираме по-добре стойностите на IC_{50} и да ги използваме при планирането на по-нататъшни експерименти в човешки ракови клетъчни линии, свързани с влиянието на едно лекарство и лекарствената интерференция.

13. Najdenski, H., Hubenov, V., Simeonov, I., Kussovski, V., **Dimitrova, L.**, Petrova, P., ... & Kabaivanova, L. (2020). Microbial biodegradation as an option for waste utilization during long-term manned space missions. *Bulg. Chem. Commun*, 52, 379-386. **IF:0.398, Q4**

Abstract: Planned space flights in foreseeable future to Mars pose many important issues to be solved by nowadays science, especially the problem of organic wastes accumulated in large quantities. The flight from Earth to Mars takes about 520 days. The crew possibly could consist of 6 cosmonauts, each of them needing daily: oxygen (1 kg of liquid), water (1-2 litres), food (2-3 kg). The total weight is about 5 kg/day or 30 kg/day for the entire crew. During long-term manned missions, the wastes are prohibited to be disposed of in space. They must be recycled. It is known that specific bacteria are able to convert waste substrates into usable nutrients and minerals. The enormous challenge is: reducing the volume of wastes to generate liquid and gaseous fractions which could be used in the production of food, water and oxygen. Simultaneously, some biogas is obtained as a source of energy. We present the development of a process of biodegradation of cellulose containing substrates similar to personal hygiene materials for cosmonauts by selected non-pathogenic bacteria. Experiments were conducted in terrestrial conditions where a degree of biodegradation of 72% of cellulose containing substrates at anaerobic, mesophilic conditions was realized. The selected bacterial community was genetically identified. The most abundant species were *Bacteroides oleiciplenus*, *Clostridium butyricum*, and *Ruminiclostridium papyrosolvens*. Concentration and profile of volatile fatty acids accompanying the biodegradation process in a bioreactor were also followed.

Резюме: Планираните космически полети до Марс в обозримо бъдеще поставят много важни въпроси, които трябва да бъдат решени от съвременната наука, особено проблема с органичните отпадъци, натрупани в големи количества. Полетът от Земята до Марс отнема около 520 дни. Екипажът евентуално би могъл да се състои от 6 космонавта, като всеки от тях се нуждае ежедневно от: кислород (1 кг течност), вода (1-2 литра), храна (2-3 кг). Общото тегло е около 5 кг/ден или 30 кг/ден за целия екипаж. По време на дългосрочни пилотирани мисии отпадъците са забранени за изхвърляне в космоса. Те трябва да бъдат рециклирани. Известно е, че специфични бактерии са способни да превръщат отпадъчните субстрати в използваеми хранителни вещества и минерали. Огромното предизвикателство е: намаляване на обема на отпадъците, за да се генерират течни и газообразни фракции, които биха могли да се използват за производството на храна, вода и кислород. Едновременно с това се получава и известно количество биогаз като източник на енергия. Представяме разработването на процес на биоразграждане на целулоза, съдържащи субстрати, подобни на материали за лична хигиена за космонавти, от подбрани непатогенни бактерии. Експериментите бяха проведени в наземни условия, където беше постигната степен на биоразграждане на 72% от целулозата, съдържаща субстрати, при анаеробни, мезофилни условия. Избраната бактериален консорциум беше генетично идентифициран. Най-разпространените видове бяха *Bacteroides oleiciplenus*, *Clostridium butyricum* и

Ruminiclostridium papyrosolvens. Проследени бяха също концентрацията и профилът на летливи мастни киселини, съпътстващи процеса на биоразграждане в биореактор.

