

Цитотоксична активност на нови лантанови (III) комплекси от бис-кумарини

Ирена Костова, Георги Момеков, **Мая Захариева**, Маргарита Караиванова

Резюме

Комплекси от лантан (III) с бис-кумарини: бис (4-хидрокси-2-оксо-2Н-хром-3-ил) - пиридин-2-ил-метан; бис (4-хидрокси-2-оксо-2Н-хром-3-ил) -пиридин-3-ил-метан и бис (4-хидрокси-2-оксо-2Н-хром-3-ил) -пиридин-4-ил-метанът бяха синтезирани чрез реакция с лантанова (III) сол и лигандите в количества, равни на моларно съотношение метал/лиганд 1:2. Комплексите бяха приготвени чрез добавяне на воден разтвор на лантанова (III) сол към воден разтвор на лиганда, като впоследствие се повишаваше рН на сместа постепенно до около 5.0 чрез добавяне на разреден разтвор на натриев хидроксид. Лантановите (III) комплекси с бис-кумарини бяха характеризирани с различни физико-химични методи - елементен анализ, IR-, ¹H- и ¹³C-ЯМР спектроскопии и мас-спектрални данни. Спектралните данни на комплексите с лантан (III) бяха интерпретирани въз основа на сравнение със спектрите на свободните лиганди. Този анализ показва, че в комплексите La (III) лигандите са координирани към металния йон чрез двете депротонирани хидроксилни групи. Въз основа на наблюдаваното m(C = O) инфрачервено изместване също се предполага участието на карбонилни групи в координацията на металния йон. Извършен бе цитотоксичен скрининг чрез МТТ анализ. В настоящото проучване извършихме сравнителна оценка на цитотоксичните ефекти на трите новосинтезирани лантанови комплекса срещу клетки острата миелоидна левкемия HL-60 и от хроничната миелоидна левкемия (CML) BV-173. В допълнение, цитотоксичните ефекти на La (III) комплекс с бис (4-хидрокси-2-оксо-2Н-хром-3-ил) -пиридин-2-ил-метан бяха оценени върху клетки SKW-3. За да се изяснят някои от механизмите на действие на наблюдаваните цитотоксични ефекти, ние оценихме способността на този комплекс да предизвиква програмирана клетъчна смърт (апоптоза с помощта на електрофоретичен анализ на агарозен гел на ДНК), изолиран от цитозолната фракция на третираните SKW-3 клетки. Освен това бе проведена микроскопична морфологична оценка на третираните клетки, за да се установят морфологичните характеристики, показателни за програмирана клетъчна смърт.

Ключови думи: Бис-кумарини; Комплекси от лантан (III); ИЧ- и ЯМР спектри; Цитотоксична активност; ДНК

Cytotoxic activity of new lanthanum (III) complexes of bis-coumarins

Irena Kostova, Georgi Momekov, **Maya Zaharieva**, Margarita Karaivanova

Abstract

Complexes of lanthanum (III) with bis-coumarins: bis(4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-pyridin-2-yl-methane; bis(4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-pyridin-3-yl-methane and bis(4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-pyridin-4-yl-methane were synthesized by reaction of lanthanum (III) salt and the ligands, in amounts equal to metal/ligand molar ratio of 1:2. The complexes were prepared by adding an aqueous solution of lanthanum (III) salt to an aqueous solution of the ligand subsequently raising the pH of the mixture gradually to ca. 5.0 by adding dilute solution of sodium hydroxide. The lanthanum (III) complexes with bis-coumarins were characterized by different physicochemical methods—elemental analysis, IR-, ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopies and mass-spectral data. The spectral data of lanthanum (III) complexes were interpreted on the basis of comparison with the spectra of the free ligands. This analysis showed that in the La (III) complexes the ligands coordinated to the metal ion through both deprotonated hydroxyl groups. On the basis of the $m(\text{C}=\text{O})$ red shift observed, participation of the carbonyl groups in the coordination to the metal ion was also suggested. Cytotoxic screening by MTT assay was carried out. In the present study, we performed comparative evaluation of the cytotoxic effects of the three newly synthesized lanthanum complexes against the acute myeloid leukemia derived HL-60 and the chronic myeloid leukemia (CML)-derived BV-173. In addition the cytotoxic effects of La (III) complex with bis(4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-pyridin-2-yl-methane were evaluated on the SKW-3 cells. In order to elucidate some of the mechanistic aspects of the observed cytotoxic effects we evaluated the ability of this complex to trigger programmed cell death (apoptosis by means of agarose gel electrophoretic analysis of DNA), isolated from the cytosolic fraction of treated SKW-3 cells. In addition, microscopic morphological evaluation of the treated cells was carried out in order to establish morphological features indicative for programmed cell death.

Keywords: Bis-coumarins; Lanthanum (III) complexes; IR- and NMR spectra; Cytotoxic activity; DNA

Цитотоксична активност на подофилотоксин-подобен лигнан от *Linum tauricum* Willd

Н. Василев, Г. Момеков, **М. Захариева**, С. Константинов, П. Бремнер, М. Хейнрич, И. Йонкова

Резюме

Настоящото проучване описва предварителната оценка на цитотоксичната активност на подобното на подофилотоксин съединение 4'-деметил-6-метоксиподофилотоксин (4'-DM-6-Mptox), изолирано като един от основните лигнани на *Linum tauricum* Willd. SSP. *tauricum*. Цитотоксичните ефекти 4'-DM-6-Mptox бяха оценени чрез колориметричен МТТ-тест в човешките левкемични клетъчни линии HL-60, BV-173 и LAMA-84. Анализът на ДНК-фрагментация и анализът на инхибиране на NF-kB бяха извършени, за да се изяснят някои от механизмите на цитотоксичното действие на изследваното съединение. Установено бе, че 4'-DM-6-Mptox проявява подчертана цитотоксичност, като стойностите на IC₅₀ са няколкократно по-ниски от тези на референтния антинеопластичен агент етопозид. Анализът на ДНК-фрагментацията разкри, че лечението с 4'-DM-6-Mptox предизвиква апоптоза в клетките на BV-173 и HL-60. Беше установено, че 4'-DM-6-Mptox индуцира концентрационно-зависимо инхибиране на NF-kB в клетки HeLa съгласно данните от теста с репортерен ген за IL-6 луцифераза, което макар и не напълно, но отчасти допринася за цитотоксичния потенциал на тествания лигнан. Въз основа на получените резултати може да се заключи, че 4'-DM-6-Mptox изисква допълнителна фармакологична и токсикологична оценка като възможно химиотерапевтично средство. Освен това поради сравнително високите му концентрации в описания растителен източник може да се обмисли възможността за използването му като предшественик за полусинтетичното производство на лекарства на базата на лигнани.

Ключови думи: 4'-деметил-6-метоксиподофилотоксин, лигнани, *Linum tauricum* Willd. SSP. *таурикум*, цитотоксичност, апоптоза, NF-kB инхибиране

Cytotoxic activity of a podophyllotoxin-like lignan from *Linum tauricum* Willd

N. Vasilev, G. Momekov, **M. Zaharieva**, S. Konstantinov, P. Bremner, M. Heinrich, I. Ionkova

Abstract

The present study describes the preliminary evaluation of the cytotoxic activity of a podophyllotoxin-like compound 4'-demethyl-6-methoxypodophyllotoxin (4'-DM-6-Mptox), isolated as one of the main lignans of *Linum tauricum* Willd. ssp. *tauricum*. The cytotoxic effects 4'-DM-6-Mptox were assessed by the MTT-dye reduction assay against the human leukemic cell lines HL-60, BV-173 and LAMA-84. DNA-fragmentation analysis and NF-kB inhibition assay were performed in order to elucidate some of the mechanistic aspects of the cytotoxic action of the investigated compound. 4'-DM-6-Mptox was found to exert prominent cytotoxicity, with IC₅₀ values being several-fold lower than those of the referent antineoplastic agent etoposide. The DNA-fragmentation analysis revealed that 4'-DM-6-Mptox treatment triggered apoptosis in BV-173 and HL-60 cells. In our hands 4'-DM-6-Mptox was found to induce concentration-dependent NF-kB inhibition in HeLa cells as assessed by the IL-6 luciferase gene reporter assay, which though not quite prominent, at least partly contributes to the cytotoxic potential of the tested lignan. On the basis of the results obtained it could be concluded that 4'-DM-6-Mptox necessitates further pharmacological and toxicological evaluation as a possible chemotherapeutic agent. Furthermore due to its relatively high concentrations in the described plant source the possibility for its use as a precursor for the semisynthetic production of lignan-based drugs, could be considered.

Key words: 4'-demethyl-6-methoxypodophyllotoxin, lignans, *Linum tauricum* Willd. ssp. *tauricum*, cytotoxicity, apoptosis, NF-k-B inhibition

In vitro токсикологична оценка на двуядрен платинов (II) комплекс с ацетатни лиганди

Георги Момеков, Дилян Фердинанов, Адриана Бакалова, **Мая Захариева**, Спиро Константинов, Маргарита Караиванова

Резюме

В настоящото изследване бе оценен токсикологичния потенциал на тумор-инхибиращия двуядрен платинов (II) комплекс (бис (ацетато) диамин-бис-1-ацетато диплатин (II) дихидрат (ВАР)), използвайки *in vitro* модели за нефротоксичност, миелосупресия и невротоксичност. По отношение на несъответствията между отличителната токсичност на клинично използваните платинови лекарства, ние използвахме три отделни референтни съединения, както следва: цисплатина за оценка на *in vitro* нефротоксичност, карбоплатина за култивирани клетки от костен мозък и оксалиплатина за определяне на *in vitro* невротоксичността, съответно. Получените резултати показват, че изследваният двуядрен комплекс притежава по-нисък потенциал да индуцира вредни ефекти върху тези типично податливи на платинова токсичност клетъчни популации в сравнение със съответните референтни лекарства. Тези открития, заедно с определената в предишни изследвания цитотоксична ефективност на този двуядрен платинов (II) комплекс срещу човешки туморни клетъчни линии, допринасят за допълнителната подробна характеристика на ВАР като потенциално антинеопластично средство.

Ключови думи : Бис (ацетато) диамин-бис-1-ацетато диплатинов (II) дихидрат, Динуклеарни платинови (II) комплекси, Цисплатин, Карбоплатин, Оксалиплатин

In vitro toxicological evaluation of a dinuclear platinum(II) complex with acetate ligands

Georgi Momekov, Dilyan Ferdinandov, Adriana Bakalova, **Maya Zaharieva**, Spiro Konstantinov, Margarita Karaivanova

Abstract

In the present study the toxicological potential of a tumor-inhibiting dinuclear platinum(II) complex (bis(acetato)diammine-bis-l-acetato diplatinum(II) dihydrate (BAP)) was evaluated, utilizing in vitro models of nephrotoxicity, myelosuppression and neurotoxicity. Regarding the discrepancies between the hallmark toxicity of the clinically utilized platinum drugs, we used three distinct referent compounds as follows cisplatin for the assessment of in vitro nephrotoxicity, carboplatin in case of cultured bone marrow cells and oxaliplatin for the determination of the in vitro neurotoxicity, respectively. The results obtained indicate that the investigated dinuclear complex is endowed by a lower potential to induce detrimental effects upon these typically susceptible platinum toxicity cellular populations as compared to the corresponding referent drugs. These findings, together with the previously encountered profound cytotoxic efficiency of this dinuclear platinum(II) complex against human tumor cell lines, recall for a further detailed evaluation of BAP as potential antineoplastic agent.

Keywords Bis(acetato)diammine-bis-l-acetato diplatinum(II) dihydrate, Dinuclear platinum(II) complexes, Cisplatin, Carboplatin, Oxaliplatin

Еруцилфосфо-N, N, N-триметилпропиламоний (еруфозин) е потенциално антимиеломно лекарство, лишено от миелотоксичност

Деян Й. Йосифов, Пламен Т. Тодоров, **Мая М. Захариева**, Калоян Д. Георгиев, Бисера А. Пиличева, Спиро М. Константинов, Мартин Р. Бергер

Резюме

Предназначение: Еруфозин е i.v. инжекционен алкилфосфохолин, който е активен срещу различни хематологични злокачествени заболявания *in vitro*. В настоящото проучване са изследвани ефектите му върху клетъчни линии на от мултиплен миелом (ММ) и върху миши и човешки хематопоеични прогениторни клетки (НРС).

Методи: Използвани са следните ММ клетъчни линии: RPMI-8226, U-266 и OPM-2. Цитотоксичността на еруфозин спрямо тези клетъчни линии се бпределена чрез колориметричния МТТ-тест. Нивата на експресия на Bcl-2, Bcl-XL и pAkt, активирането на каспази, както и разцепването на PARP, бяха изследвани чрез Western blotting. Миграцията бе оценена чрез модифициран анализ на Бойдън. Хематологичната токсичност на еруфозин бе изследвана с помощта на тестове за клоногенност с нормални НРС от миши или човешки произход.

Резултати: Открита е значителна цитотоксична активност на еруфозин спрямо ММ клетъчните линии. Сравнението на характеристиките на индуцираната от еруфозин клетъчна смърт в трите клетъчни линии разкрива сложен механизъм на действие с апоптозни механизми, преобладаващи в клетките на OPM-2, и неапоптозни механизми, преобладаващи в U-266 клетки. Чувствителността на ММ клетъчните линии към индуцираната от еруфозин апоптоза корелира обратнопропорционално с нивото на експресия на Bcl-XL. Еруфозинът участва в синергични взаимодействия с различни лекарства. Освен това, той показва мощна активност, инхибирайки миграцията на RPMI-8226 клетки. Еруфозинът не е токсичен за нормалните НРС от миши или човешки произход и дори стимулира прогениторите от човешка пъпна връв към образуване на гранулоцитно-макрофагеални колонии колонии. Освен това еруфозинът намалява токсичността на бендамустин върху миши НРС.

Заклучения: Като цяло, представените данни разкриват, че еруфозинът има потенциал като антимиеломен химиотерапевтик и заслужава по-нататъшно развитие.

Ключови думи: Еруфозин, Алкилфосфохолини, Множествен миелом, Цитотоксичност, Хематопоеични прогенератори, Антимиграционно действие

Erucylphospho-N,N,N-trimethylpropylammonium (erufosine) is a potential antimyeloma drug devoid of myelotoxicity

Deyan Y. Yosifov, Plamen T. Todorov, **Maya M. Zaharieva**, Kaloyan D. Georgiev, Bissera A. Pilicheva, Spiro M. Konstantinov, Martin R. Berger

Abstract

Purpose Erufosine is an i.v. injectable alkylphosphocholine which is active against various haematological malignancies in vitro. In the present study, its effects on multiple myeloma (MM) cell lines and on murine and human hematopoietic progenitor cells (HPCs) were investigated. Methods The following MM cell lines were used: RPMI- 8226, U-266 and OPM-2. The cytotoxicity of erufosine against these cell lines was determined by the MTT-dye reduction assay. Bcl-2, Bcl-XL and pAkt expression levels, activation of caspases, as well as cleavage of PARP, were studied by Western blotting. Migration was evaluated by a modified Boyden-chamber assay. The haematologic toxicity of erufosine was assessed using clonogenicity assays with normal HPCs of murine or human origin. Results Significant cytotoxic activity of erufosine against the MM cell lines was found. Comparison of the characteristics of erufosine-induced cell death in the three cell lines revealed a complex mode of action with apoptotic mechanisms prevailing in OPM-2 cells and non-apoptotic mechanisms prevailing in U-266 cells. The sensitivity of the MM cell lines to erufosine-induced apoptosis correlated inversely with the Bcl-XL expression level. Erufosine participated in synergistic interactions with various drugs. Furthermore, it showed potent migration-inhibiting activity in RPMI-8226 cells. Erufosine was not toxic to normal HPCs of murine or human origin and even stimulated progenitors from human umbilical cord blood to form granulocyte/macrophage colonies. Moreover, erufosine ameliorated the toxicity of bendamustine to murine HPCs. Conclusions Overall, the data presented reveal that erufosine could have potential as an antimyeloma drug and deserves further development.

Keywords Erufosine, Alkylphosphocholines, Multiple myeloma, Cytotoxicity, Haematopoietic progenitors, Antimigratory activity

Еруфозин потиска рака на гърдата *in vitro* и *in vivo* поради неговата активност върху протеините PI3K, c-Raf и Akt

Илина К. Динева, **Мая М. Захариева**, Спиро М. Константинов, Хансборг Айбл, Мартин Р. Бергер

Резюме

Цел: Това проучване изследва антинеопластичния ефект на мембранно-активния алкилфосфохолин еруфозин при модели на карцином на гърдата *in vitro* и *in vivo* и определя влиянието му върху сигналните пътища PI3K/Akt и Ras/Raf/MAPK.

Методи: Антипролиферативният ефект на еруфозин *in vitro* бе определен с колориметричен МТТ тест и антинеопластичната ефикасност върху растежа на тумора бе изследван чрез измерване на средните общи туморни обеми на третирани и контролни групи плъхове. Имуноблот анализът бе използва за откриване на промени в нивото на експресия на сигналните молекули p-PI3K (p-p85), p-Akt при Thr 308 и p-cRaf.

Резултати: Въз основа на стойностите на IC₅₀ (40 µM), клетъчните линии от карцином на млечна жлеза MCF-7 и MDA-MB 231, които са съответно положителни и отрицателни за естрогенния рецептор, бяха еднакво чувствителни към еруфозин. В допълнение, еруфозинът причини намаляване на фосфорилирането на PI3K (p85), Akt (PKB) при Thr 308 и cRaf и в двете клетъчни линии. Освен това, прилагането на еруфозин при плъхове с карцином на млечна жлеза, индуциран автохтонно с метилнитрозоурея, предизвиква значителна дозозависима редукция на тумора с повече от 85% (p <0,05), при добра поносимост, загуба на телесно тегло до максимално 7% и намалена смъртност (2 от 35, вместо 6 от 18 при контролната група, p <0,002).

Заклучения: Резултатите ясно показват, че еруфозин притежава висока *in vitro* антинеопластична активност не само в човешки клетъчните линии от карцином на млечна жлеза, но и при карцином на млечната жлеза при плъхове *in vivo*. Освен това може да се установи, че механизмът на действие на еруфозин включва влияние върху сигналните пътища на PI3K/Akt и Ras/Raf/MAPK.

Ключови думи: Еруфозин, карцином на гърдата, PI3K, Akt, Ras, Raf

Erufosine suppresses breast cancer in vitro and in vivo for its activity on PI3K, c-Raf and Akt proteins

Ilinia K. Dineva, **Maya M. Zaharieva**, Spiro M. Konstantinov, Hansjoerg Eibl, Martin R. Berger

Abstract

Purpose: This study investigated the antineoplastic effect of the membrane active alkylphosphocholine erufosine in breast carcinoma models in vitro and in vivo and determined its influence on the PI3K/Akt and Ras/Raf/MAPK signaling pathways.

Methods: The antiproliferative effect of erufosine in vitro was determined by the MTT dye reduction assay, and the antineoplastic efficacy on tumor growth was investigated by relating the mean total tumor volumes of treated and control rats. Immuno blot analysis was used for detecting changes in the expression level of the signal molecules p-PI3K (p-p85), p-Akt at Thr 308 and p-cRaf.

Results: Based on their IC₅₀ (40 µM, respectively), the breast carcinoma cell lines MCF-7 and MDA-MB 231, which are estrogen receptor positive and negative, respectively, were equally sensitive to erufosine. In addition, erufosine caused dose-dependent decreases in the phosphorylation of PI3K (p85), Akt (PKB) at Thr 308 and cRaf in both cell lines. Moreover, administration of erufosine to rats bearing autochthonous methylnitrosourea induced rat mammary carcinomas caused a significant dose-related tumor remission by more than 85 % (p<0.05), which was well tolerated, as evidenced by a body weight loss of maximally 7 % and reduced tumor related mortality (2 of 35 instead of 6 of 18 controls, p<0.002).

Conclusions The results clearly indicate that erufosine possesses high antineoplastic activity not only in human breast cancer cell lines in vitro but also in rat mammary carcinoma in vivo. In addition, it can be derived that the mechanism of action of erufosine involves influence on both, PI3K/Akt and Ras/Raf/MAPK signaling pathways.

Keywords: Erufosine, Breast carcinoma, PI3K, Akt, Ras, Raf

Еруфозин едновременно индуцира апоптоза и автофагия чрез модулиране на сигналния път Akt – mTOR в орален плоскоклетъчен карцином

Вайшали Капур, **Мая М. Захариева**, Сатя Н. Дас, Мартин Р. Бергер

Резюме

Изследвахме противотуморната активност на еруфозин в клетъчните линии на плоскоклетъчен орален карцином по отношение на клетъчната пролиферация, клоногенността, индукцията на автофагия/апоптоза, клетъчен цикъл и сигналния път mTOR. Еруфозинът показва дозозависима цитотоксичност във всички клетъчни линии, предизвиква автофагия, както и апоптоза, блокира клетъчния цикъл в G2 и модулира експресията на циклин D1. По-нататък еруфозинът инхибира фосфорилирането на основни компоненти на mTOR пътя, като p-Akt при Ser473 и Thr308 остатъци, p-Raptor, p-mTOR, p-PRAS40 и неговите субстрати надолу по веригата p-p70S6K и p-4EBP1 по дозозависим начин. Предварителното третиране на туморните клетки с p-mTOR siRNA усили цитотоксичния ефект на еруфозин, сравнимо с цисплатина, но в по-силна степен от рапамицина.

Ключови думи: орален плоскоклетъчен рак, mTOR сигнална каскада, алкилфосфохолин, еруфозин, автофагия

Erufosine simultaneously induces apoptosis and autophagy by modulating the Akt–mTOR signaling pathway in oral squamous cell carcinoma

Vaishali Kapoor, **Maya M. Zaharieva**, Satya N. Das, Martin R. Berger

Abstract

We investigated the anticancer activity of erufosine in oral squamous carcinoma cell lines in terms of cell proliferation, colony formation, induction of autophagy/apoptosis, cell cycle and mTOR signaling pathway. Erufosine showed dose-dependent cytotoxicity in all cell lines, it induced autophagy as well as apoptosis, G2 cell cycle arrest and modulation of cyclin D1 expression. Further erufosine downregulated the phosphorylation of major components of mTOR pathway, like p-Akt at Ser473 and Thr308 residues, p-Raptor, p-mTOR, p-PRAS40 and its downstream substrates p-p70S6K and p-4EBP1 in a dose-dependent manner. The pre-treatment of tumor cells with p-mTOR siRNA increased cytotoxic effects of erufosine comparable to cisplatin but higher than rapamycin.

Keywords: Oral squamous cell cancer, mTOR signaling cascade, Alkylphosphocholine, Erufosine, Autophagy

Тритерпеноидни сапонини от корените на *Gypsophila trichotoma* Wender

Лоранс Вуткен-Назабадиоко, Ренета Гевренова, Николас Борие, Доминик Харакат,
Шарлот Сая, Александър Венг, Маянк Тхакур, **Мая Захариева**, Макс Хенри

Резюме

От корените на *Gypsophila trichotoma* Wender бяха изолирани единадесет тритерпеноидни сапонини. (*G. trichotoma* Wender. Var. *Trichotoma*) (*Caryophyllaceae*), заедно с едно известно съединение. Структурите са описани въз основа на обширен ЯМР анализ (^1H , ^{13}C NMR, COZY, TOCSY, ROESY, HSQC и HMBC), чрез анализ на HR-ESI-MS и ESI-MSn. Сапонините съдържат често срещания гипсогенин като агликон, заместен при С-3 с трисахарид и при С-28 с олигозахарид с фукозен остатък, тъй като сапонините, изолирани от *Gypsophila perfoliata* L., произхождат от Китай. Олигозахаридът, прикрепен към С-28, е заместен с ацетил и (или) сулфатни групи. Цитотоксичността на сапониновия екстракт от *G. trichotoma* бе оценена спрямо плъща алвеоларна макрофагеална клетъчна линия, NR8383 и клетъчните линии от човешка левкемия U937 и BV-173. Синергичният ефект на аминокислотите сапонини, по-рано изолирани от *G. trichotoma*, беше тестван за потенциал да повишава цитотоксичността на прицелния токсин в клетките HER14.

Ключови думи: *Gypsophila trichotoma*, *Gypsophila perfoliata*, *Caryophyllaceae*,
тритерпеноидни сапонини, цитотоксична активност

Triterpenoid saponins from the roots of *Gypsophila trichotoma* Wender

Laurence Voutquenne-Nazabadioko, Reneta Gevrenova, Nicolas Borie, Dominique Harakat, Charlotte Sayagh, Alexander Weng, Mayank Thakur, **Maya Zaharieva**, Max Henry

Abstract

Eleven triterpenoid saponins were isolated from the roots of *Gypsophila trichotoma* Wender. (*G. trichotoma* Wender. var. *trichotoma*) (Caryophyllaceae), together with one known compound. The structures were established on the basis of extensive NMR analysis (¹H, ¹³C NMR, COSY, TOCSY, ROESY, HSQC, and HMBC), completed by analysis of HR-ESI-MS and ESI-MSn. The saponins have the commonly found gypsogenin as the aglycone substituted at C-3 with trisaccharide and at C-28 with oligosaccharide through a fucose residue, as saponins isolated from *Gypsophila perfoliata* L. originated from China. The oligosaccharide attached to C-28 is substituted with acetyl and (or) sulfate groups. The cytotoxicity of the saponin extract from *G. trichotoma* was evaluated against a rat alveolar macrophage-like cell line NR8383 and human leukemia cell lines U937 and BV-173. The synergistic effect of the aminoacyl saponins, previously isolated from *G. trichotoma*, was tested for its ability to enhance the cytotoxicity of the targeted toxin in HER14 cells.

Keywords: *Gypsophila trichotoma*, *Gypsophila perfoliata*, Caryophyllaceae, Triterpenoid saponins, Cytotoxic activity

Новият алкилфосфохолин еруфозин намалява костномозъчната токсичност на класически цитостатици

Мая Маргаритова Захариева, Николай Петков, Спиро Михайлов Константинов, Мартин Р. Бергер

Резюме

Множество конвенционални цитостатици увреждат бързо пролифериращите тъкани. Еруфозинът притежава селективна активност срещу туморните клетки, без да засяга нормалната хематопоеза. В настоящото проучване изследвахме комбинацията от еруфозин с клинично използвани цитостатични лекарства върху левкемични клетки и дълготрайни култури на миши костен мозък, използвайки МТТ- и CFU (колони образуващи единици)-тестове. Еруфозинът намали костномозъчната токсичност на всички използвани цитостатици и стимулира растежа на GM-CFU. Използваните комбинации показаха синергични лекарствени взаимодействия срещу злокачествени клетки. В заключение, еруфозин може да се използва в комбинации с класически цитостатици, тъй като понижава тяхната костномозъчна токсичност.

Ключови думи: костномозъчната токсичност, еруфозин, класически цитостатици, гранулоцитно-макрофагеални колонии, синергични взаимодействия

The new alkylphosphocholine erufosine ameliorates bone marrow toxicity of classical cytostatics

Maya Margaritova Zaharieva, Nikolay Petkov, Spiro Mihaylov Konstantinov, Martin R. Berger

Abstract

Numerous conventional cytostatics run the risk of damaging fast-proliferating tissues. Erufosine possesses selective activity against tumor cells without affecting the normal haematopoiesis. In the current study we investigated the combination of erufosine with clinically used cytoreductive agents on leukemic cells and long term bone marrow cell cultures by using the MTT- and CFU (colony forming units)-assays. Erufosine ameliorated the bone marrow toxicity of all cytostatics used and stimulated the growth of GM-CFUs. Combinations used showed synergistic drug interactions against malignant cells. In conclusion, erufosine could be used in combinations with classical cytostatics because it lowers their bone marrow toxicity.

Key words: bone marrow toxicity, erufosine, classical cytostatics, granulocyte/macrophage colonies, synergistic interactions

Глава 7

Съвременна терапия на хронична миелоидна левкемия

М.М. Захариева, Г. Амудов, С.М. Константинов и М. Л. Генова

Abstract

Тази глава оценява ефективността на употребата на Imatinib за лечение на CML. Сега той е най-разпространеното лекарство от първа линия за лечение на CML и е отличителен белег на целевите лекарствени терапии за злокачествени заболявания. Резистентността към това лекарство обаче е основен проблем, който не може да се преодолее чрез увеличаване на дозата (Jabbour, Kantarjian et al. 2007; O'Hare, Eide et al. 2007). Терапията с едно лекарство с иматиниб може да не е най-добрият дългосрочен вариант при много от пациентите с CML и трябва да се обмислят други подходи. Има много нови съединения, които са в процес на развитие и в предклинични и клинични изпитвания, някои от тях показваха многообещаващи резултати. Дазатиниб, нилотиниб и босутиниб са представители на TKI от по-ново поколение, които са ефективни и безопасни за употреба при пациенти, резистентни на иматиниб и/или нетолерантни към лекарството ХМЛ пациенти. Много е вероятно новите Bcr-Abl мутанти да станат резистентни към тези малки молекулни инхибитори. Затова са необходими други терапевтични подходи. Комбинацията от TKIs с други не-Bcr-Abl инхибитори е необходима за преодоляване на резистентността.

Ключови думи: Imatinib, TKIs, пациенти с ХМЛ, съвременна терапия, миелоидна левкемия

Chapter 7

Modern Therapy of Chronic Myeloid Leukemia

M.M. Zaharieva, G. Amudov, S.M. Konstantinov and M. L. Guenova

Abstract

This chapter evaluates the the effectivity of usage of Imatinib for treatment of CML. It is now the most common first line drug for the treatment of CML and is a hallmark of target drug therapies for malignant diseases. However resistance to this drug is a major problem that can't be overcome by increasing the dosage (Jabbour, Kantarjian et al. 2007; O'Hare, Eide et al. 2007). Single agent therapy with imatinib may not be the best long-term option in many of the CML patients and other approaches should be considered. There are many novel compounds that are in development and in preclinical and clinical trials, some of them showed very promising results. Dasatinib, nilotinib and bosutinib are representatives of the newer generation TKIs which are effective and safe to use in imatinib-resistant and/or - intolerant CML patients. It is very likely that new Bcr-Abl mutants will become resistant to 240 Leukemia these small-molecule inhibitors. Therefore, other therapeutic approaches are required. The combination of TKIs with other inhibitors of non-Bcr-Abl targets is needed to overcome the resistance.

Keywords: Imatinib, TKIs, CML patients, Modern Therapy, Myeloid Leukemia

Цитотоксичен ефект на получения биотехнологичен юстицидин В върху човешки лимфомни клетки

Й. Илиева, И. Железова, Т. Атанасова, **М. М. Захариева**, П. Сашева, И. Йонкова, С. Константинов

Резюме

Цел на работата: Проучването имаше за цел да оцени антинеопластичната активност на юстицидин В *in vitro* и да охарактеризира общия му токсикологичен профил *in vivo*. Антинеопластичната активност на арилнафтален-лигнин, юстицидин В, беше оценена в панел от човешки лимфомни клетъчни линии и сравнена с етопозид като референтно съединение. Проведен бе скрининг на цитотоксичността след 24, 48 и 72 ч експозиция с помощта на МТТ-редукционен тест. Наблюдаван бе цитотоксичен ефект, зависим от дозата и времето и стойностите на IC_{50} варираха от 0,17 μ M (RPMI-8226, 72 часа) до 183 μ M (U-266, 24 часа) и повече от 200 μ M (HD-MY-Z, 24 и 48 h). Активирането на каспаза 3 и 8 участваше в индуцирането на програмирана клетъчна смърт в DONH-2 клетъчна линия. NF- κ B модулация настъпи в DONH-2 и HH клетки. Общата токсичност при мишки след i. p. инжекция, също бе тествана. Най-високата приложена доза (50 mg/kg = 137,25 μ M) не показва никаква токсичност. Юстицидин В притежава мощна и селективна антинеопластична активност, свързана със способността му да индуцира програмирана клетъчна смърт в човешки клетъчни линии, получени от NHL, при концентрации, които могат да бъдат достигнати при мишки без токсичност.

Ключови думи: Апоптоза, Арилнафтален лигнан, Цитотоксичност, Етопозид, Юстицидин В, *Linum leonii*

Cytotoxic effect of the biotechnologically-derived justicidin B on human lymphoma cells

Y. Ilieva, I. Zhelezova, T. Atanasova, **M. M. Zaharieva**, P. Sasheva, I. Ionkova, S. Konstantinov

Abstract

Purpose of work: The study was aimed to assess the antineoplastic activity of justicidin B in vitro and to search for its general toxicological profile in vivo. The anti-neoplastic activity of the aryl-naphthalene lignin, justicidin B, was assessed in a panel of human lymphoma cell lines and compared with etoposide as a reference compound. A screening of the cytotoxicity after 24, 48 and 72 h exposure was performed by the MTT-dye reduction assay. Dose and time-dependent cytotoxic effect was observed and the IC₅₀ values ranged from 0.17 μ M (RPMI-8226, 72 h) to 183 μ M (U-266, 24 h) and more than 200 μ M (HD-MY-Z, 24 and 48 h). Activation of caspase 3 and 8 was involved in the induction of programmed cell death in DOHH-2 cell line. NF- κ B modulation occurred in DOHH-2 and HH cells. The general toxicity in mice after i. p. injection was also tested. The highest applied dose (50 mg/kg = 137.25 μ M) did not show any toxicity. Justicidin B possesses definite and potent selective antineoplastic activity, related to its ability to induce programmed cell death in NHL derived human cell lines at concentrations that can be reached in mice without toxicity.

Keywords: Apoptosis, Aryl-naphthalene lignan, Cytotoxicity, Etoposide, Justicidin B, *Linum leonii*

Антинеопластичен потенциал на куркумин (съвместно проучване в България и Германия)

Й. Илиева, К. Калоянов, Д. Йосифов, Б. Робев, И. Железова, М. Генова, А. Михова, Г. Балаценко, **М. М. Захариева**, М. Р. Бергер, С. М. Константинов

Резюме:

Ниската безопасност на съществуващите антинеопластични лекарства и проблемът с лекарствената мултирезистентност стимулират търсенето на нови растителни съединения като потенциални антинеопластични средства. Един от използваните подходи за идентифициране на перспективни кандидати се основава на етнофармакологията. Куркуминът е жълтият пигмент на кърито и се използва в традиционната индийска медицина. В рамките на ЕС той има статут на хранителна съставка (E100) и се намира в много хранителни добавки. Той е изолиран от *Curcuma longa* L. и е докладван като инхибитор на NF- κ B и индуктор на апоптоза с антиоксидант, понижаващ холестерола, противовъзпалителен, антипаразитен, антибактериален и антитуморен потенциал. Доказано е, че куркуминът притежава широк спектър от плеiotропни активности, включително противотуморни ефекти и протекция на нормалния костен мозък. Куркуминът проявява антинеопластична активност в различни злокачествени клетъчни линии *in vitro*, като кожен Т-клетъчен лимфом, остра миелоидна левкемия и малигнени клетки от карцином на пикочния мехур. При лимфомни и левкемични клетъчни линии куркуминът индуцира апоптоза, както се доказва от активирането на каспаза, разделянето на PARP и олигонуклеозомната фрагментация на ДНК. Експресията на миелоидния маркер CD13 (аминопептидаза N) е свързана с по-бързата индукция на апоптоза. В допълнение, куркуминът повишава нивата на глутатион. Прилагането на куркумин *in vivo* доведе до намаляване на индуцирани от цисплатина хромозомни аберации (антикластогенен ефект). Тази констатация разкрива, че куркуминът е предпочитан партньор за комбинации с антинеопластични средства, за да се засили тяхната активност и да се намалят неблагоприятните ефекти. Очевидна е необходимостта от нови препарати с куркумин поради ниската му бионаличност след перорален прием. Кожните и интравезикални приложения на куркумин дават възможност за успешната му клинична куркумин.

Ключови думи: антикластогенен ефект, антинеопластична активност, CTCL, куркумин, локално лечение

Antineoplastic potential of curcumin (cooperative study in Bulgaria and Germany)

Y. Ilieva, K. Kaloyanov, D. Yosifov, B. Robev, I. Zhelezova, M. Genova, A. Mihova, G. Balatzenko, **M. M. Zaharieva**, M. R. Berger, S. M. Konstantinov

Abstract:

The unfavorable safety of existing anticancer medications and the issue of multidrug resistance have fuelled the search for novel plant compounds as potential antineoplastic agents. One of the used approaches for identifying perspective candidates is based on ethnopharmacology. Curcumin is the yellow pigment of curry and has been employed in traditional Indian medicine. Within the EU it has the status of food ingredient (E100) and remains in many food additives. It is isolated from *Curcuma longa* L. and has been reported as NF- κ B inhibitor and apoptosis inducer with antioxidant, cholesterol lowering, anti-inflammatory, anti-parasitic, antibacterial and antitumor potential. Curcumin has been shown to exert a wide spectrum of pleiotropic activities including antitumor effects and protection of the normal bone marrow. It possesses antineoplastic activity in various malignant cell lines *in vitro*, such as cutaneous T cell lymphoma, acute myeloid leukemia and urinary bladder cancer cells. In lymphoma and leukemia cell lines curcumin induces apoptosis as evidenced by caspase activation, PARP cleavage and oligonucleosomal DNA fragmentation. Expression of the myeloid marker CD13 (aminopeptidase N) is associated with faster apoptosis induction. In addition, curcumin causes concentration-dependent glutathione level increase. Application of curcumin *in vivo* resulted in protection against cisplatin-induced chromosomal aberrations (anticlastogenic effect). This finding reveals curcumin as preferable partner for combinations with antineoplastic agents in order to potentiate their activity and ameliorate the adverse effects. There is a clear need for new curcumin formulations because of its low bioavailability after oral intake. Cutaneous and intravesical curcumin applications remain a possibility for successful clinical use of curcumin.

Keywords: Anticlastogenic effect, Antineoplastic activity, CTCL, Curcumin, Topical treatment

Еруфозин предизвиква автофагия и апоптоза при плоскоклетъчен карцином на устната кухина: роля на сигналния път Akt – mTOR

Вайшали Капур, Мая М. Захариева и Мартин Р. Бергер

Резюме

Новият алкилфосфохолин еруфозин проявява селективна противотуморна активност, но не и миелотоксичност. Механизмът му на действие не е напълно изяснен, но е свързан с дефосфорилиране на Akt и Rb. Нашето изследване разкри нов механизъм, който лежи в основата на антинеопластичната активност на еруфозин чрез инхибиране на сигналната каскада на рапамицина (mTOR) в клетъчни линии на плоскоклетъчен карцином на устната кухина. Еруфозин показва дозо-зависима цитотоксичност и едновременно индуцира както автофагия, така и апоптоза чрез превръщане на свързаната с микротубулите протеинова лека верига 3B-I (LC3B-I) в LC3B-II, активиране на каспази-3/7 и разцепване на ADP-рибозна полимераза (PARP) във всички клетъчни линии. Освен това се наблюдава спиране на клетъчния цикъл в G2 заедно с инхибиране на циклин D1. Тези ефекти на еруфозин се дължат на модулиране на сигналния път mTOR. Той инхибира p-Akt, p-Raptor, p-mTOR и неговите субстрати надолу по веригата, p-p70S6K и p-4EBP1. p-PRAS40 беше инхибиран до почти напълно. Нещо повече, блокирането на експресията на p-mTOR чрез малки интерфериращи РНК (siRNA) повишава чувствителността на туморните клетки към еруфозин до степен, сравнима с ефектите на цисплатина и по-висока от тази на рапамицин. Освен това, той показва адитивни ефекти в комбинация с 5-флуорурацил и цисплатин. Нашето проучване следователно показва, че еруфозинът индуцира апоптоза, автофагия, спира клетъчния цикъл и понижава сигнализацията на mTOR в тестваните клетъчни линии. Той има потенциал за противотуморно лекарство за самостоятелно приложение или в комбинация с други химиотерапевтични средства.

Ключови думи: еруфозин, аутофагия, апоптоза, клетъчен карцином, сигнален път Akt – mTOR

Erufosine Induces Autophagy and Apoptosis in Oral Squamous Cell Carcinoma: Role of the Akt–mTOR Signaling Pathway

Vaishali Kapoor, **Maya M. Zaharieva**, and Martin R. Berger

Abstract

The novel alkylphosphocholine erufosine exerts selective antitumor activity, but no myelotoxicity. Its mechanism of action is not fully understood, but is related to dephosphorylation of Akt and Rb. Our study revealed a novel mechanism underlying the anticancer activity of erufosine via downregulation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling cascade in oral squamous cell carcinoma cell lines. Erufosine showed dose-dependent cytotoxicity and simultaneously induced both autophagy and apoptosis via conversion of microtubule-associated protein light chain 3B-I (LC3B-I) to LC3B-II, caspase-3/7 activation, and Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage, respectively, in all the cell lines. In addition, G2 cell cycle arrest was observed along with cyclin D1 downregulation. These effects of erufosine were due to modulation of the mTOR signaling pathway. It readily downregulated p-Akt, p-Raptor, p-mTOR, and its downstream substrates, p-p70S6K and p-4EBP1. p-PRAS40 was reduced to undetectable levels. Moreover, blockage of p-mTOR expression by small interference RNA (siRNA) increased tumor cell sensitivity to erufosine, which was comparable to cisplatin, but higher than that of rapamycin. Furthermore, it showed additive effects on tumor cell cytotoxicity in combination with 5-fluorouracil and cisplatin. Our study therefore indicated that erufosine induces apoptosis, autophagy, cell cycle arrest, and downregulates mTOR signaling in oral cancer cell lines. It has potential as an anticancer drug either alone or in combination with other chemotherapeutic agents.

Keywords: erufosine, Autophagy, Apoptosis, Cell Carcinoma, Akt–mTOR Signaling Pathway

Намалената експресия на протеина на ретинобластома показва, че свързаният с него сигнален път е от съществено значение за медирането на антинеопластичната активност на еруфозин

Мая М. Захариева, Милен Кирилов, Минкуанг Чай, Стефан М. Бергер, Спиро Константинов, Мартин Р. Бергер

Резюме

Еруфозинът е нов антинеопластичен агент от групата на алкилфосфохолините, който модулира сигналната трансдукция и индуцира апоптоза в различни левкемични и туморни клетъчни линии. Настоящото проучване е предназначено да изследва за първи път механизма на резистентност към еруфозин в злокачествени клетки с трайно намалена експресия на ретинобластомния протеина (Rb). Имайки предвид големия брой злокачествени заболявания с намалено ниво на този туморен супресор, това проучване се счита за важно за клиничното приложение на еруфозин, самостоятелно или в комбинация, при пациенти с компрометирана експресия на гена *RB1*. За тази цел бяха използвани клонинги на левкемичната Т-клетъчна линия SKW-3, които бяха генно модифицирани да експресират постоянно различно ниски нива на Rb. Алкилфосфохолин-индуцираната апоптоза стимулира експресията на циклин-зависимия киназен инхибитор p27Kip1 и инхибира синтеза на циклин D3, като по този начин причинява спиране на клетъчния цикъл във фаза G2 и смърт на клетките с експресия на див тип Rb. За разлика от тях, Rb-дефицитът възпрепятства промените, предизвикани от еруфозин в експресията на тези протеини и отменя блокирането на G2 фазата, което е свързано с намалена антипролиферативна и антиклоногенна активност на съединението. В заключение, анализът на нашите резултати показва за първи път, че сигналният път на Rb е от съществено значение за медирането на антинеопластичната активност на еруфозин и неговата ефективност при пациенти със злокачествени заболявания и неговата ефективност може да се предвиди чрез определяне на статуса на Rb.

Ключови думи: еруфозин, Rb, SKW-3, злокачествени заболявания

Reduced Expression of the Retinoblastoma Protein Shows That the Related Signaling Pathway Is Essential for Mediating the Antineoplastic Activity of Erufosine

Maya M. Zaharieva, Milen Kirilov, Minguang Chai, Stefan M. Berger, Spiro Konstantinov, Martin R. Berger

Abstract

Erufosine is a new antineoplastic agent of the group of alkylphosphocholines, which interferes with signal transduction and induces apoptosis in various leukemic and tumor cell lines. The present study was designed to examine for the first time the mechanism of resistance to erufosine in malignant cells with permanently reduced expression of the retinoblastoma (Rb) protein. Bearing in mind the high number of malignancies with reduced level of this tumor-suppressor, this investigation was deemed important for using erufosine, alone or in combination, in patients with compromised *RB1* gene expression. For this purpose, clones of the leukemic T-cell line SKW-3 were used, which had been engineered to constantly express differently low Rb levels. The alkylphosphocholine induced apoptosis, stimulated the expression of the cyclin dependent kinase inhibitor p27Kip1 and inhibited the synthesis of cyclin D3, thereby causing a G2 phase cell cycle arrest and death of cells with wild type Rb expression. In contrast, Rb-deficiency impeded the changes induced by erufosine in the expression of these proteins and abrogated the induction of G2 arrest, which was correlated with reduced antiproliferative and anticlonogenic activities of the compound. In conclusion, analysis of our results showed for the first time that the Rb signaling pathway is essential for mediating the antineoplastic activity of erufosine and its efficacy in patients with malignant diseases may be predicted by determining the Rb status.

Keywords: erufosine, antineoplastic agent, SKW-3, malignant diseases

Профил на амиди на хидроксидинаминовата киселина в *Solanum schimperianum* Hochst с UPLC-HRMS

Юлиян Войников, Димитрина Желева-Димитрова, Ренета Гевренова, Валентин Лозанов, Мая М. Захариева, Ива Цветкова, Христо Найденов, Сакина Яги, Нахла Фадл Алмулах, Георги Момеков

Резюме

Новооткритият N^ε-ферулоил лизин (**1**) заедно с 16 известни амида на хидроксидинаминовата киселина (HCAA) бяха идентифицирани в корените на суданското растение *Solanum schimperianum* Hochst (син. *Solanum carense* Dunal, Solanaceae). Структурата на **1** е установена на базата на 1D (¹H, ¹³C NMR) и 2D (¹H-¹H COZY, ¹H-¹³C HSQC) ЯМР анализ, заедно с UV-vis, HR-ESI-MS и ESI-MS² анализи за фрагментация. HCAAs са анализирани с помощта на течна хроматография, свързана с Orbitrap маспектрометър (Thermo Scientific), при режим на паралелна реакция (PRM). За първи път в род *Solanum* са докладвани осем HCAA, включително аматини и кадаверинови амиди, както и N^ε-ферулоил лизин и синапоил путресцин. N^ε-ферулоил лизин и хидрометаноловият екстракт от корените на *S. schimperianum* бяха изследвани за антиоксидантна активност, използвайки тестовете DPPH и ABTS, както и FRAP. Антимикробната активност бе изследвана върху панел от патогенни бактерии и гъби по метода на микроразреждане в течна среда (BMD). N^ε-ферулоил лизин демонстрира по-силна радикал-улавяща активност при DPPH (IC₅₀ = 85.83 µg/ml), ABTS (IC₅₀ = 255.54 µg / ml) и FRAP (0.44 ± 0.02 mM TE/mg dw) в сравнение с екстракта на корена. N^ε-ферулоил лизин прояви значително по-висока антимикробна активност спрямо двата щама *Staphylococcus aureus* NBIMCC 3359 (MIC / MBC = 112,5 µg/ml) и устойчив на пеницилин ATCC 6538P (MIC = 112,5 µg/ml) в сравнение с общия екстракт на *S. schimperianum* (MIC = 1,25 и 2,5 mg/ml, съответно). Екстрактът показва антимикробна активност спрямо *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes* и *Candida albicans* (MIC = 1,25 mg/ml). N^ε-ферулоил лизинът допринася за наблюдаваната защита срещу оксидативен стрес и антимикробната активност.

Ключови думи: амиди на хидроксидинаминова киселина, UPLC-HRMS, *Solanum schimperianum*, антиоксидантна активност, антимикробен потенциал, Orbitrap

Hydroxycinnamic acid amide profile of *Solanum schimperianum* Hochst by UPLC-HRMS

Yulian Voynikova, Dimitrina Zheleva-Dimitrova, Reneta Gevrenova, Valentin Lozanov, **Maya M. Zaharieva**, Iva Tsvetkova, Hristo Najdenski, Sakina Yagie, Nahla Fadl Almoulah, Georgi Momekov

Абстракт

A newly discovered N^ε-feruloyl lysine (**1**) together with 16 known hydroxycinnamic acid amides (HCAAs) were identified in the roots of Sudanese plant *Solanum schimperianum* Hochst (syn. *Solanum carense* Dunal, *Solanaceae*). The structure of **1** was established on the basis of ¹D (¹H, ¹³C NMR) and 2D (¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HSQC) NMR analysis, together with UV-vis, HR-ESI-MS and ESI-MS² fragmentation analyses. HCAAs were analyzed using liquid chromatography coupled to an Orbitrap mass spectrometer (Thermo Scientific) using parallel-reaction monitoring (PRM) mode. For the first time, eight HCAAs including agmatine and cadaverine amides, as well as N^ε-feruloyl lysine and sinapoyl putrescine, were reported in genus *Solanum*. N^ε-feruloyl lysine and the hydromethanolic extract of *S. schimperianum* roots were evaluated for their antioxidant activity using free radical DPPH and ABTS scavenging, and ferric reducing power (FRAP) methods. The antimicrobial activity was estimated on a panel of pathogenic bacteria and fungi by the broth micro dilution method (BMD). N^ε-feruloyl lysine demonstrated stronger DPPH (IC₅₀=85.83 μg/ml), ABTS (IC₅₀=255.54 μg/ml) and FRAP (0.44 ± 0.02 mM TE/mg dw) activity compared to the root extract. N^ε-feruloyl lysine exhibited significantly higher antimicrobial activity against both *Staphylococcus aureus* strains NBIMCC 3359 (MIC/MBC=112.5 μg/ml) and penicillin resistant ATCC 6538P (MIC=112.5 μg/ml) than the total *S. schimperianum* extract (MIC=1.25 and 2.5 mg/ml, respectively). The extract showed antimicrobial activity towards *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes* and *Candida albicans* (MIC=1.25 mg/ml). N^ε-feruloyl lysine had function for the observed protection against oxidative stress and antimicrobial activity.

Keywords: Hydroxycinnamic acid amides, UPLC-HRMS, *Solanum schimperianum*, Antioxidant activity, Antimicrobial potential, Orbitrap

Антимикробен и антиоксидантен потенциал на екстракти, извлечени с различни разтворители от медицинското растение *Geum urbanum* L.

Людмила Димитрова, Мая М. Захариева, Милена Попова, Неделина Костадинова, Ива Цветкова, Вася Банкова и Христо Найденски

Резюме

За много видове *Geum* е известно, че са богати на биологично активни съединения (БАВ) и следователно могат да бъдат източник на нови натурални продукти с фармакологичен потенциал. Лекарственото растение *Geum urbanum* L. е широко разпространено в България и се използва в народната медицина. В настоящото изследване метанолният екстракт от корените и надземните части на *G. urbanum* и техните фракции (петролен етер, етилацетат и n-бутанол) са изследвани за антибактериална и радикал-улавяща активности. Фракциите, извлечени с етилацетат и n-бутанол инхибираха растежа на Грам-положителни патогени и опортюнистични бактерии от рода *Staphylococcus* (MIC EtOAc: 0,078 mg/ml надземни части и 0,156 mg/ml корени; MIC n-BuOH: 0,156 mg / ml надземни части и 1,25 mg / ml корени) и вида *Bacillus cereus* по-силно от другите тествани екстракти и фракции (MIC EtOAc: 0,078 mg/ml надземни части и 0,156 mg/ml корени; MIC n-BuOH: 0,156 mg/ml антенна и 0,078 mg/ml корени) и показваха съответната радикал-улавяща активност (EtOAc: EC50 1,5 мкг/мл антенна, 0,8 мкг /мл корени; n-BuOH: 4,5 мкг / мл антенна; 3,7 μg/ml корени). В допълнение, тяхното общо фенолно съдържание бе количествено определено (% от сухи фракции на EtOAc от корени 61%, от надземни части 32%; от сухи n-BuOH фракции от корени 16%, от надземни части 13%). Седем съединения бяха изолирани и идентифицирани спектроскопски от етилацетатния екстракт. Два ацетилирана рамонозида на елаговата киселина бяха открити за първи път в род *Geum* и три други, торментинова киселина, нига-ичигозид F1 и 3,3'-ди-О-метиленова киселина-4-О-β-d-глюкопиранозид бяха новооткрити за вида *G. urbanum*. Нашите резултати потвърждават, че *G. urbanum* L. е перспективно лекарствено растение и заслужава по-нататъшни, по-подробни проучвания.

Ключови думи: *Geum urbanum* L., Растителни екстракти, Антибактериална активност, Минимална инхибиторна концентрация, Радикал-улавяща активност, Феноли

Antimicrobial and antioxidant potential of different solvent extracts of the medicinal plant *Geum urbanum* L.

Lyudmila Dimitrova, Maya M. Zaharieva, Milena Popova, Nedelina Kostadinova, Iva Tsvetkova, Vassya Bankova and Hristo Najdenski

Abstract

Many *Geum* species are known to be rich in biologically active compounds and therefore could be a source of new natural products with pharmacological potential. The medicinal plant *Geum urbanum* L. is widespread in Bulgaria and has been used in folk medicine. In the present study, the methanol extracts of the roots and aerial parts of *G. urbanum* and their fractions (petroleum ether, ethyl acetate and *n*-butanol) were investigated for antibacterial and radical scavenging activity. The ethyl acetate and *n*-butanol fractions inhibited the growth of Gram-positive pathogenic and opportunistic bacteria from the genus *Staphylococcus* (MIC EtOAc: 0.078 mg/ml aerial and 0.156 mg/ml roots; MIC *n*-BuOH: 0.156 mg/ml aerial and 1.25 mg/ml roots) and the species *Bacillus cereus* stronger than the other extracts and fractions tested (MIC EtOAc: 0.078 mg/ml aerial and 0.156 mg/ml roots; MIC *n*-BuOH: 0.156 mg/ml aerial and 0.078 mg/ml roots), and showed corresponding radical scavenging activity (EtOAc: EC₅₀ 1.5 µg/ml aerial, 0.8 µg/ml roots; *n*-BuOH: 4.5 µg/ml aerial; 3.7 µg/ml roots). Additionally, their total phenolic content was quantified (% of dry EtOAc fractions of roots 61%, of aerial parts 32%; of dry *n*-BuOH fractions of roots 16%, of aerial parts 13%). Seven compounds were isolated and identified spectroscopically from the ethyl acetate extract. Two acetylated ellagic acid rhamnosides were found for the first time in the genus *Geum* and three others, tormentic acid, niga-ichigoside F1, and 3,3'-di-*O*-methylellagic acid-4-*O*-β-d-glucopyranoside, were newly detected for the species *G. urbanum*. Our results reveal that *G. urbanum* L. is a perspective medicinal plant and deserves further, more detailed studies.

Keywords: *Geum urbanum* L., Plant extracts, Antibacterial activity, Minimal inhibitory concentration, Radical scavenging activity, Phenolics

Глава 11

Моделиране и технико-икономически анализ на водораслите за биоенергия и копродукти

А. Д. Крумов, Ф. Б. Шойфеле, Д. Е. Г. Тригерос, А. Н. Моденес, **М. Захариева**, Х. Найденски

Резюме

Промисленото производство на биодизел от микроводорасли изисква широко мащабни системи за отглеждане и събиране на биомасата, при което разходите за единица площ трябва да бъдат сведени до минимум. В голям мащаб условията за работа на растежа на водорасли трябва да бъдат прецизно и стабилно контролирани и оптимизирани. Такива процеси са най-икономически жизнеспособни, когато се комбинират с усвояването на CO₂ от емисиите на димните газове, с процесите на пречистване на отпадъчните води и / или с извличането на висококачествени съединения за приложение в други производства. Понататъшните усилия за производството на микроводорасли трябва да бъдат насочени към разработването на интегрирани подходи за намаляване на разходите за пълно използване на микроводораслите в мащабни системи с цел глобално намаляване на разходите.

Обзорът анализира този подход, който ще допринесе за устойчивостта и конкурентоспособността на микроводораслите на пазара. Използваемостта на енергията на базата на микроводорасли ще бъде силно свързана с:

1. Научни иновации: създаване на нови PBR, математически инструменти, методи за генетична модификация, подбор на щамове от микроводорасли с изключително висок потенциал за свръхпродукция на желаните метаболити;
2. Преодоляване на технологичните ограничения: проектиране на процеса и PBR; оптимизация и контрол; търсена инфраструктура; наличие на конкурентни технологии и други източници на енергия; самостоятелната технология не работи; концепцията за биорефинерия в съчетание с цялостното използване на биомаса може да бъде ключът към успеха.
3. Минимизиране на икономическите ограничения (глобални и регионални фактори): разходи за производство на биомаса (суровина, процес, транспорт, логистика и др.); енергийна ефективност на продуктивната верига; конкурентоспособност на суровината от биомаса за други цели (например, промишлени, хранителни и др.);
4. Политическа готовност: за стимулиране технологията;
5. Защита на околната среда и социално въздействие: свързани с опазването на околната среда, здравето на хората и качеството на живота. Всъщност тези различни ограничения са силно свързани и зависими от времето.

Ключови думи: водорасли, комплексен подход, концепция за биологична рафинерия, иновативни PBR, димни газове

Chapter 11

Modeling and Technoeconomic Analysis of Algae for Bioenergy and Coproducts

A. D. Kroumov, F. B. Scheufele, D. E. G. Trigueros, A. N. Modenes, **M. Zaharieva**, H. Najdenski

Abstract

Industrial production of microalgal biodiesel requires large-scale cultivation and harvesting systems in which costs per unit area have to be minimized. At a large scale, the algal growth working conditions need to be precisely and robustly controlled and optimized. Such processes are most economical viable when combined with sequestration of CO₂ from flue gas emissions, with wastewater remediation processes, and/or with the extraction of high-value compounds for application in other process industries. Further efforts on microalgae production should be focused on the development of integrated approaches for reducing costs of complete microalgae biomass utilization in large-scale systems, aiming a global cost reduction.

The review analysis this approach which will contribute to the sustainability and market competitiveness of the microalgae industry. The feasibility of microalgae biomass- based energy will be strongly associated to:

1. Scientific innovations: creation of novel PBRs, mathematical tools, genetic modification methods, selection of microalgae strains with extremely high potential for overproduction of desired metabolites.
2. Overcoming of technological restrictions: process and PBRs design; optimization and control; demanded infrastructure; existence of competitive technologies and other energy sources; standalone technology does not work; biorefinery concept combined with total biomass utilization can be the key of success.
3. Minimizing of economical restrictions (global and regional factors): biomass production costs (feedstock, process, transport, logistics, etc.); energetic efficiency of the productive chain; competitive of the biomass feedstock for other purposes (e.g., industrial, food, etc.);
4. Political willingness: subsidies and incentives for the technology;
5. Environmental protection and social impact: related to the preservation of the environment, human health care, and life quality. In fact, these various restrictions are strongly interrelated and time-dependent.

Keywords: complex approach, biorefinery concept, innovative PBRs, flue gases

HPLC-UV и LC – MS анализи на ацилхининови киселини в *Geigeria alata* (DC) Oliv. & Hiern. и принос към техния антиоксидантен и антимикробен капацитет

Димитрина Желева-Димитрова Ренета Гевренова, Мая М. Захаријева, Христо Найдeнски, Силвия Русева, Валентин Лозанов, Весела Балабанова, Сакина Яги, Георги Момеков и Ваньо Митев

Резюме:

Въведение - *Geigeria alata* е традиционно растение, използвано в Суданската народна медицина за лечение на диабет, кашлица, епилепсия и чревни проблеми.

Цел - Да се анализират фенолните киселини в корените и листата на *Geigeria alata* и да се оценят техните антиоксидантни и антимикробни активности.

Методология - Фенолните киселини във водно-метанолови екстракти бяха идентифицирани чрез LC – MS. Основните съединения бяха изолирани с използване течна хроматография с ниско налягане. Количественият анализ на фенолни киселини бе извършен чрез валидиран HPLC-UV метод с граници на отчитане, вариращи от 0,04 до 0,57 µg / mL. 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH), 2,2'-азинобис- (3-етилбензотиазин-6-сулфонова киселина) (ABTS) и желязо-редуциращата антиоксидантна сила (FRAP) бяха използвани за оценка на антиоксидантната активност. В допълнение, минималната инхибираща концентрация и минималната бактерицидна концентрация срещу панел от патогенни бактерии и гъбички бяха определени чрез теста на микроразрежданията в течна среда.

Резултати - За първи път бяха открити протекатехинова, кафеени, р-кумароилхининова, кофеоилсинапоилхининови, кофеоилферулоилхининови, три ферулоилхининови, шест кофеоилхининови киселини и хексозид на кафеената киселина в корените на *Geigeria alata* с LC – MS. HPLC-UV анализите показваха, че 3,5-дикафеоилхининовата киселина ($25,96 \pm 2,08$ mg/g сухо тегло (DW)) е най-разпространената фенолна киселина в корените, докато 4,5-дикафеоилхининовата киселина ($8,99 \pm 0,56$ mg/g DW) беше основното съединение в листата. 3,5-дикафеоилхининовата киселина демонстрира по-силна радикална-улавяща и редуцираща активности в сравнение със суровите екстракти и положителната контрола 5-кофеоилхининова киселина. 3,4,5-Трикафеоилхининовата киселина показва най-висок антибактериален потенциал спрямо пеницилин чувствителни и резистентни щамове на *Staphylococcus aureus*, както и резистентния на метицилин щам на *S. aureus*.

Заклучение - Съдържанието на кофеоилхининовите киселини до 6,22% в корените на *Geigeria alata* определя този вид като нов източник, богат на тези биоактивни молекули.

Ключови думи: Кафеоилхинови киселини; *Geigeria alata*; HPLC-UV; LC-MS

HPLC-UV and LC–MS Analyses of Acylquinic Acids in *Geigeria alata* (DC) Oliv. & Hiern. and their Contribution to Antioxidant and Antimicrobial Capacity

Dimitrina Zheleva-Dimitrova, Reneta Gevrenova,^a Maya M. Zaharieva, Hristo Najdenski,
Silviya Ruseva, Valentin Lozanov, Vessela Balabanova, Sakina Yagi, Georgi Momekov and
Vanio Mitev

Abstract:

Introduction – *Geigeria alata* is a traditional plant used in Sudanese folkmedicine for treatment of diabetes, cough, epilepsy and intestinal complaints.

Objective – To analyze phenolic acids in *Geigeria alata* roots and leaves and to evaluate their antioxidant and antimicrobial activities.

Methodology – Phenolic acids in the aqueous-methanol extracts were identified by LC–MS. Major compounds were isolated using low-pressure liquid chromatography. The quantitative analysis of phenolic acids was performed by a validated HPLC-UV method with limits of detection ranging from 0.04 to 0.57 µg/mL. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azinobis- (3-ethylbenzothiazine-6-sulphonic acid) (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods were used for antioxidant activity evaluation. In addition, the minimal inhibitory concentration and the minimal bactericidal concentration against a panel of pathogenic bacteria and fungi were determined by the broth microdilution test.

Results – For the first time protocatechuic, caffeic, p-coumaroylquinic, caffeoylsinapoylquinic, caffeoylferuloylquinic, three feruloylquinic, six caffeoylquinic acids, and a caffeic acid hexoside were detected in *Geigeria alata* roots by LC–MS. HPLC-UV analyses showed that 3,5-dicaffeoylquinic acid (25.96 ± 2.08 mg/g dry weight (DW)) was the most abundant phenolic acid in roots, while 4,5-dicaffeoylquinic acid (8.99 ± 0.56 mg/g DW) was the main compound present in leaves. 3,5-Dicaffeoylquinic acid demonstrated stronger radical scavenging activity and reducing power compared with the crude extracts and the positive control 5-caffeoylquinic acid. 3,4,5-Tricaffeoylquinic acid revealed the highest antibacterial potential against the penicillin sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* strains, as well as methicillin-resistant *S. aureus*.

Conclusion – The caffeoylquinic acids content of up to 6.22% in *Geigeria alata* roots establishes this species as a new source rich in these bioactive molecules.

Keywords: Caffeoylquinic acids; *Geigeria alata*; HPLC-UV; LC–MS

Предварително изследване на биоактивни фракции от судански растения *Solanum Schimperianum* Hochst.

Весела Балабанова, Юлиан Войников, Димитрина Желева-Димитрова, Ренета Гевренова,
Мая Захариева, Христо Найденов

Резюме

Solanum schimperianum Hochst. (син. *Solanum carense* Dunal) е тропично растение, разпространено в Судан и Южния регион на Саудитска Арабия. Съобщава се, че екстрактът от корени притежава антиоксидантен и антимикробен потенциал. Метод на екстракция в твърда фаза (SPE), последван от течна хроматография - мас-спектрометрията (LC-MS) в отрицателен и положителен режим се използваха за анализ на корените на *S. schimperianum* (RSF) и стероидни алкалоидни фракции от стебловата кора (SSF). Соланопубамин беше предварително идентифициран заедно с други два 3-аминостероидни алкалоида в изследваните проби с висока разделителна способност - йонизация с електроспрей - масспектрометрия (HR-ESI-MS) и MS/MS анализ на фрагментацията. Освен това бяха доказани галова, кафеена и хлорогенова киселина, както в RSF, така и в SSF. RSF проявява антибактериален потенциал срещу на Gram (+) патогени - устойчиви на метицилин *Staphylococcus aureus* (MRSA) и *Listeria monocytogenes*, съответно с MIC (минимална инхибираща концентрация) 31,25 µg (еквивалент на сухо тегло, dw) и 62,7 µg dw. 3-аминостероидните алкалоиди и фенолните киселини са отговорни за наблюдавания антибактериален потенциал.

Ключови думи: *Solanum schimperianum*, стероидни алкалоиди, LC-ESI / HRMS, MRSA

Preliminary study on bioactive fractions from sudanese plant *Solanum Schimperianum* Hochst.

Vessela Balabanova, Yulian Voynikov, Dimitrina Zheleva-Dimitrova, Reneta Gevrenova, Maya Zaharieva_, Hristo Najdenski_

Abstract

Solanum schimperianum Hochst. (syn. *Solanum carense* Dunal) is a tropical plant distributed in Sudan and Southern region of Saudi Arabia. The roots extract has been reported to possess antioxidant and antimicrobial potential. A solid-phase extraction (SPE) method followed by a liquid chromatography – mass spectrometry (LC-MS) in negative and positive mode is reported for the assay of *S. schimperianum* roots (RSF) and stem bark (SSF) steroidal alkaloid fractions. Solanopubamine was tentatively identified along with two other 3-amino steroidal alkaloids in the studied samples by means of high resolution – electro spray ionization – mass spectrometry (HR-ESI-MS) and MS/MS fragmentation analysis. In addition, gallic, caffeic and chlorogenic acid were evidenced in both RSF and SSF. RSF exhibited antibacterial potential against the Gram (+) pathogens methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Listeria monocytogenes* with MIC 31.25 µg (dry weigh equivalent, dw) and 62.7 µg dw, respectively. 3-amino steroidal alkaloids and phenolic acids had a function for the observed antibacterial potential.

Key words: *Solanum schimperianum*, steroidal alkaloids, LC-ESI/HRMS, MRSA

Антинеопластичен потенциал на куркумин включен в полимерни матрици, насочени срещу човешки малигнени клетки

Антониос Трохопулос, Ервин Иванов, Гюлян Якуб, Илия Рашков, Невенка Манолова, Деница Момекова, **Мая Захариева**, Христо Найденски, Мартин Бергер, Спиро Константинов

Резюме

Цели:

Злокачествените заболявания при човека са втората причина за смъртност след сърдечно-съдовите заболявания. Повечето от раковите заболявания са нелечими поради развитието на резистентност и метастази. Не-Ходжкиновите лимфоми (NHL) принадлежат към най-бързо растящите злокачествени тумори при хората и влияят драстично на качеството на живот и степента на оцеляване. НХЛ поглъщат огромен финансов ресурс заради скъпите целеви лекарства, приети през целия живот. Данните, получени през последните години, показват, че природните съединения като куркумин могат да намалят растежа на тумора в различни модели, комбиниращи антинеопластични, противовъзпалителни и антимикробни ефекти. Куркуминът има широк фармакологичен спектър на действие, въпреки изключително ниската си бионаличност. Най-благоприятният ефект на куркумина е инхибирането на NF-κB транскрипционния фактор, който е критичен регулатор на апоптозата в нормални и туморни клетки.

Методи: Цитотоксичната активност на куркумин е изследвана в човешки NHL (кожен Т-клетъчен лимфом, CTCL) клетки, използвайки ISO 10993-5-2009 (MTT тест). В допълнение, куркуминът е бил включен в био-съвместими електроизпредени полимерни матрици с цел повишаване на клетъчната доставка на куркумин и био-наличност. Инхибирането на NF-κB се измерва, като се използва специфичен ELISA. Антимикробната активност на матриците бе тествана върху патогенни щамове *Staphylococcus aureus* съгласно ISO 20776-1: 2006 (E).

Резултати: Натоварените с куркумин матрици показаха значително инхибиране на растежа на тумора. Матриците с куркумин бяха бактериостатични срещу *S. aureus*.

В заключение, нетоксичното естествено съединение куркумин има забележителна антинеопластична активност *in vitro*. Новите полимерни препарати с куркумин показват значителна цитотоксичност и освобождаване на активно съединение. Полимерните матрици с куркумин могат да служат като хирургични импланти и превръзки за заздравяване на рани и за лечение на кожни лезии при редки туморни заболявания.

Ключови думи: CTCL, куркумин, NF-κB, полимерни подложки за електрофункция

Antineoplastic potential of curcumin loaded polymeric formulations against human malignant cells

Antonios Trochopoulos, Ervin Ivanov, Gyuljan Yakub, Ilia Rashkov, Nevenka Manolova, Denitsa Momekova, **Maya Zaharieva**, Hristo Najdenski, Martin Berger, Spiro Konstantinov

Abstract

Objectives:

Human malignancies are the second cause of death after cardiovascular diseases. Most of the cancers are incurable due to resistance development and metastases. Non-Hodgkin's lymphomas (NHL) belong to the fastest growing malignant tumors in humans and drastically affect the quality of life and the survival rate. NHLs engulf huge financial resource because of the expensive targeted medications taken lifelong. Evidences obtained during the last years reveal that natural compounds such as curcumin can reduce tumor growth in different models combining antineoplastic, anti-inflammatory and antimicrobial effects. Curcumin has a broad pharmacological spectrum of activities despite of its extremely low bioavailability. The most advantageous curcumin effect is the inhibition of the NF- κ B transcription factor, which is a critical apoptosis regulator in normal and tumor cells.

Methods: The cytotoxic activity of curcumin was studied in human NHL (cutaneous T-cell lymphoma, CTCL) cells using ISO 10993-5-2009 (MTT test). In addition, curcumin was included in biocompatible electrospun polymeric mats with the aim to increase cellular curcumin delivery and bioavailability. NF- κ B inhibition was measured using specific ELISA. The antimicrobial activity of the electrospun mats was tested on pathogenic *Staphylococcus aureus* strains according to ISO 20776-1:2006(E).

Results: Curcumin loaded mats showed significant tumor growth inhibition. The mats with curcumin were bacteriostatic against *S. aureus*.

In conclusion, the non-toxic natural compound curcumin has remarkable antineoplastic activity in vitro. The new polymeric curcumin formulations showed significant cytotoxicity and active compound release. Electrospun polymeric mats could serve as surgical implants and wound healing dressing to treat the orphan disease skin lesions.

Keywords: CTCL, Curcumin, NF- κ B, Polymeric electrospun mats

Нови данни в рутинната процедура за математическа оценка на данни за цитотоксичност *in vitro* от ракови клетки

Мая М. Захаријева, Антониос Трохопулос, Людмила Димитрова, Мартин Р. Бергер, Христо Найдeнски, Спиро Константинов, Александър Д. Крумов

Резюме:

В онкофармакологията общата процедура за изчисляване на концентрации със среден инхибиращ ефект (IC_{50}) от експериментални данни се основава на използването на добре установени кинетични модели, представляващи инхибиторни ефекти на лекарства върху човешки ракови клетки. Няколко широко разпространени софтуерни програми, като GraphPad Prism и CompuSyn предлагат възможности за изчисляване на IC_{50} чрез модела на Chou. В това проучване анализирахме резултатите от тези две софтуерни програми и ги сравнихме с процедурата за нелинейно програмиране, написана от нас в символния софтуер MAPLE. Последният оцени IC_{50} по-точно и коефициентът на корелация R е по-добър във всички анализирани данни. Демонстрирахме ефективността на нелинейните програмиращи процедури 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 определим по-добре стойностите на IC_{50} и да ги използваме при планирането на по-нататъшни експерименти с използването на човешки малигнени клетъчни линии, свързани с влияние на едно лекарството, както и при взаимодействията на две лекарства и тяхното влияние.

Ключови думи: нелинейно програмиране, модели на кинетика, лекарства, цитотоксичност *in vitro*, ракови клетъчни линии при човека

New Insights in Routine Procedure for Mathematical Evaluation of *in vitro* Cytotoxicity Data from Cancer Cell Lines

**Maya M. Zaharieva, Antonios Trochopoulos, Lyudmila Dimitrova, Martin R. Berger,
Hristo Najdenski, Spiro Konstantinov, Alexander D. Kroumov**

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.

Keywords: Non-linear programming, Kinetics models, Drugs, *in vitro* cytotoxicity, Human cancer cell lines.

Гипсофила сапонини засилват цитотоксичността на етопозид в лимфомни клетки HD-MY-Z

Ренета Гевренова, Мая М. Захариева, Александър Д. Крумов, Лоранс Воткен-Назабадиоко, Димитрина Желева-Димитрова, Весела Балабанова, Христо М. Хайденски, Спиро Константинов

Резюме

Бе установено, че 3,28-бисдезмозиди на глюкуронидите на тритерпеновите карбоксилни киселини от олеананов тип (GOTCAB) се натрупват в корените на *Gypsophila* L. В проучването изследвахме възможните синергични ефекти на *Gypsophila trichotoma* GOTCABs и цитостатичен етопозид към клетъчната линия на Hodgkin лимфом HD-MY-Z. Комбинираните ефекти с етопозид са оценени с помощта на софтуер MAPLE за символна математика. Течна хроматография-масова спектрометрия позволява идентифициране или предварително определяне на 28-ядрени GOTCAB структури заедно с 6 монодесмозиди в кореновия екстракт. Тестваните сапонини на базата на гипсогенин притежават C-28 свързана с естери верига, заместена с ацетил, цис/транс метоксицинамоил и ацетил и сулфатни групи. Не се наблюдава цитотоксичен ефект до 20 µg/mL при нормални миши фибробласти (CCL-1 клетъчна линия) и лимфомни клетки. Етопозидът при самостоятелно приложение се характеризира с $IC_{50}=93$ µg/mL. В присъствието на ацетилирани сапонини (20 µg/mL), се наблюдава силен синергизъм ($Fa = 0,8$, $CI = 0.1$) с IC_{50} 11 µg/mL. Комбинацията индуцира апоптоза, което е доказано чрез активиране на каспазите, повишени нива на цитозолни моно- и олигонуклеозоми и ядрена фрагментация, заедно със сигнификантно увеличаване на генерирането на ROS. Резултатите показват, че арабинозата във веригата C-3 и ацетилирането на веригата C-28 на сапонините са важни структурни характеристики за повишаване на цитотоксичната активност на етопозид. Следователно, тритерпеновите сапонини са ценен инструмент за подобряване на ефикасността на цитостатиците.

Ключови думи: GOTCAB сапонини, *Gypsophila trichotoma*, Етопозид, синергизъм, апоптоза, ROS

Gypsophila saponins enhance the cytotoxicity of etoposide in HD-MY-Z lymphoma cells

Reneta Gevrenova, Maya M. Zaharieva, Alexander D. Kroumov, Laurence Voutquenne-Nazabadioko, Dimitrina Zheleva-Dimitrova, Vessela Balabanova, Hristo M. Hajdenskib, Spiro Konstantinov

Abstract

Glucuronide Oleanane-type Triterpenoid Carboxylic Acid 3,28-Bidesmosides (GOTCAB) are accumulated in *Gypsophila* L. roots. In the study we aimed at investigating the possible synergistic effects of *Gypsophila trichotoma* GOTCABs and cytostatic etoposide towards the Hodgkin lymphoma cell line HD-MY-Z. The combination effects with etoposide were evaluated using the symbolic mathematical software MAPLE. Liquid chromatography-mass spectrometry allowed the identification or tentative assignment of 28 core GOTCAB structures together with 6 monodesmosides in the root extract. Tested gypsogenin-based saponins possessed C-28 ester-bonded chain substituted with acetyl, cis/trans methoxycinnamoyl and both acetyl and sulfate groups. No cytotoxic effect was observed up to 20 µg/mL on normal mice fibroblasts (CCL-1 cell line) and lymphoma cells. Etoposide alone exerted IC_{50} 93 µg/mL. In the presence of acetylated saponins (20 µg/mL), a strong synergism ($Fa=0.8$, $CI=0.1$) was observed with IC_{50} 11 µg/mL. The combination induced apoptosis witnessed by caspase activation, elevated levels of cytosolic mono- and oligonucleosomes, and nuclear fragmentation together with discernible increase in ROS generation. The results emphasize the arabinose in the C-3 chain and acetylation pattern of the C-28 chain of the saponins as important structural features for cytotoxicity enhancing activity. Triterpenoid saponins are a valuable tool to improve the efficacy of cytostatics.

Keywords: GOTCAB saponins, *Gypsophila trichotoma*, Etoposide ,Synergism , Apoptosis, ROS

Алкилфосфолипидите са модулатори на сигналната трансдукция с потенциал за антинеопластична терапия

Ферда Калеагьосоглу, **Мая М. Захариева**, Спиро М. Константинов и Мартин Р. Бергер

Резюме

История: Алкилфосфолипидите (APLs) са получени синтетично от компоненти на клетъчната мембрана, което е техен таргет и по този начин променят клетъчната сигнализация и предизвикват различни ефекти. Това проучване прави преглед на механизма на действие на антинеопластичните, антипротозойни, антибактериални и антивирусни активности на APL, както и тяхното клинично приложение.

Методи: Като основа за този обзор беше направен анализ на съществуващата литература.

Резултати: APL се интегрират в липидните рафтове и променят сигналните каскади на фосфолипаза D и C, които от своя страна модулират PI3K/Akt/mTOR и RAS/RAF/MEK/ERK сигналните пътища. Чрез обратна връзка, сигналната верига SAPK/JNK също е засегната. Тези промени водят до спиране на клетъчния цикъл във фаза G2/M и впоследствие предизвикват програмирана клетъчна смърт. Наличните знания за инхибиране на фосфорилирането на AKT, фосфорилирането на mTOR и инхибирането на активирането на Raf правят APL привлекателни кандидати за модерно медицинско лечение, което се основава на персонализирана диагноза и терапия. В съответствие с техния необичаен профил на активност, техните странични ефекти произлизат главно от холиномиметичната активност и повлияват основно стомашно-чревния тракт. Тези аспекти, заедно с липсата на миелосупресия, правят APL подходящи за съвременна комбинирана терапия. Въпреки че досега клиничният успех е ограничен при неоплазии, употребата на милтефозин срещу лейшманиоза е водещ начин за по-добро разбиране на тяхната оптимизирана употреба.

Заклучение: Нови програми за синтез генерират деривати с повишен терапевтичен ефект, липозомни препарати, както и диагностични (или терапевтични) производни с оптимизирани свойства. Очаква се тези иновативни модификации да проправят пътя за по-нататъшното успешно развитие на APL.

Ключови думи: Механизъм на действие, модулация на клетъчната сигнализация, фармакодинамика, противоракови дейности, фармакокинетика, клинични изпитания.

Alkylphospholipids are Signal Transduction Modulators with Potential for Anticancer Therapy

Ferda Kaleağasıoğlu, **Maya M. Zaharieva**, Spiro M. Konstantinov and Martin R. Berger

ABSTRACT

Background: Alkylphospholipids (APLs) are synthetically derived from cell membrane components, which they target and thus modify cellular signaling and cause diverse effects. This study reviews the mechanism of action of anticancer, antiprotozoal, antibacterial and antiviral activities of APLs, as well as their clinical use.

Methods: A literature search was used as the basis of this review.

Results: APLs target lipid rafts and alter phospholipase D and C signaling cascades, which in turn will modulate the PI3K/Akt/mTOR and RAS/RAF/MEK/ERK pathways. By feedback coupling, the SAPK/JNK signaling chain is also affected. These changes lead to a G2/M phase cell cycle arrest and subsequently induce programmed cell death. The available knowledge on inhibition of AKT phosphorylation, mTOR phosphorylation and Raf down-regulation renders APLs as attractive candidates for modern medical treatment, which is based on individualized diagnosis and therapy. Corresponding to their unusual profile of activities, their side effects result from cholinomimetic activity mainly and focus on the gastrointestinal tract. These aspects together with their bone marrow sparing features render APLs well suited for modern combination therapy. Although the clinical success has been limited in cancer diseases so far, the use of miltefosine against leishmaniasis is leading the way to better understanding their optimized use.

Conclusion: Recent synthetic programs generate congeners with the increased therapeutic ratio, liposomal formulations, as well as therapeutic (or theranostic) derivatives with optimized properties. It is anticipated that these innovative modifications will pave the way for the further successful development of APLs.

Keywords: Mode of action, modulation of cell signaling, pharmacodynamics, anticancer activities, pharmacokinetics, clinical trials.

**Изолиране и идентифициране на нови щамове от микроводорасли с
антибактериална активност върху хранителни патогени. Инженерен подход за
оптимизиране на синтеза на желаните метаболити**

Адилсън Рикен Шуелтер, Александър Димитров Крумов, Камила Лариса Хинтерхолц,
Адриана Фиориник, Даниела Естелита Гоес Тригероса, Елиан Груска Вендрусколо, **Мая
Маргаритова Захариева**, Апаресидо Нивалдо Моденес

Резюме

Тази статия представя стратегия за изолиране, идентифициране и оценка на микроводорасли, синтезиращи биологично активни съединения (ВАС) с антимикробна активност срещу хранителни и други патогени. Първоначално водните проби, съдържащи микроводорасли, бяха подложени на обогатяване, последван от стандартна процедура за получаване на чиста култура. Пречистена ДНК от изолатите на микроводораслите се използва за секвениране на амплифицираната 18S rDNA геномна област, което доведе до идентифициране на *Poterioochromonas malhamensis*, *Chlorella sp.*, *Micractinium sp.*, *Tetrademus sp.* и *Desmodesmus sp.* Всички изолирани щамове се култивират в 1-L плоскопластинни PBRs, като *Poterioochromonas malhamensis* бе единственият, който показва антибактериална активност по агар дифузия метод. Освен това, щамът PPEQ-01 бе култивиран при различни видове и мащаби на фотобиореактори (PBR), интензитет и спектър на падащата светлина, с цел да се изследва и докаже антибактериалния потенциал на щама. Етанолни и метанолни супернатанти или хидрофилни и метанолни екстракти, получени от биомаса, култивирана в различни условия, доведоха до образуване на зони на инхибиране на растежа на бактериите около импрегнираните дискове, използвани в агар дифузия тест. Хидрофилният екстракт, получен от биомаса, култивирана при осветеност със зелена светлина проявява по-силна активност спрямо всички тествани патогенни бактерии в сравнение с останалите екстракти. Резултатите, получени с новия изолиран щам *Poterioochromonas malhamensis*, доказаха ефективността на иновативния комплексен подход, прилаган към ВАС, с цел идентифициране на микроводорасли, които имат антимикробна активност.

Isolation and identification of new microalgae strains with antibacterial activity on food-borne pathogens. Engineering approach to optimize synthesis of desired metabolites

Adilson Ricken Schuelter, Alexander Dimitrov Kroumov, Camila Larissa Hinterholz, Adriana Fiorinic, Daniela Estelita Goes Triguerosa, Eliane Gruska Vendruscolo, **Maya Margaritova Zaharieva**, Aparecido Nivaldo Módenes

Abstract

This paper presents a strategy for isolation, identification and evaluation of microalgae strains synthesizing biologically active compounds (BAC) with antimicrobial activity against food-borne and other pathogens. Water samples containing microalgae were initially submitted to the enrichment process, followed by standard procedure for obtaining pure culture. Purified DNA from the microalgae isolates was used for sequencing the amplified 18S rDNA genomic region, which resulted in the identification of *Poterioochromonas malhamensis*, *Chlorella sp.*, *Micractinium sp.*, *Tetradismus sp.* and *Desmodesmus sp.* All isolated strains were cultivated in 1-L flat-plate PBRs, with the *Poterioochromonas malhamensis* being the only one to show antibacterial activity in agar diffusion assay. Further, PPEQ-01 strain was cultured under different types and scales of PBR, intensity and spectrum of the incident light, in order to study and prove the antibacterial potential of the strain. Ethanolic and methanolic supernatants, or hydrophilic and methanolic extracts produced from biomass cultivated in different conditions led to formation of bacterial growth inhibition halos around the impregnated disks used in the agar diffusion test. The hydrophilic extract, obtained from biomass cultured under green illumination, exhibited stronger activity against all tested pathogenic bacteria as compared to the other extracts. The results obtained with the new isolated *Poterioochromonas malhamensis* strain proved efficiency of the innovative complex approach applied to BAC aiming the identification of microalgae that present antimicrobial activity.

Keywords: New microalgae strains, Biologically active compounds, Antimicrobial activity, Isolation protocol, Molecular identification

Мицеларният куркумин подобрява антибактериалната активност на алкилфосфохолините еруфозин и милтефозин срещу патогенни щамове *Staphylococcus aureus*

Мая Маргаритова Захариева, Александър Димитров Крумов, Людмила Димитрова, Ива Цветкова, Антониос Трохопулос, Спиро Михайлов Константинов, Мартин Райнхолд Бергер, Милена Момчилова, Красимира Йончева и Христо Миладинов Найденски

Резюме

В светлината на възникващата бактериална резистентност към антибиотици с широк спектър на действие, търсенето на нови антибактериални терапевтици и комбинации от лекарства е една от най-предизвикателните теми в днешно време. В настоящото проучване изследвахме за първи път антибактериалните и инхибиращи ефекти на биофилми на третото поколение антинеопластичен алкилфосфохолин (АРС) еруфозин срещу патогенни щамове *Staphylococcus aureus* в сравнение с прототипа на този фармакологичен клас лекарства т.н. милтефозин. Търсихме също синергични антибактериални комбинации между АРС и куркумин, включени в кополимерни мицели на базата на Pluronic® P123 или смес от Pluronic® P123 и Pluronic® F127 (P123/F127). Получените количествени експериментални данни за редокс-активността и взаимодействията лекарство-лекарство бяха оценени чрез използване на математически модели в софтуера MAPLE. Подобно на милтефозин, еруфозинът показва умерен бактериостатичен ефект при клинично значими концентрации (50-60 $\mu\text{mol/L}$) и инхибира редокс-активността на третираните бактерии до 90% при минимални инхибиторни концентрации. Ефектът и на двата АРС спрямо устойчиви на метицилин стафилококи е подобрен чрез комбинации с P123/F127 мицеларен CRM в съотношение 1:1. Еруфозинът показва по-силно инхибиране на биофилм при по-ниски средни инхибиращи концентрации ($\text{MBIC}_{50} = 1,87 \mu\text{mol/L}$), отколкото милтефозин ($\text{MBIC}_{50} = 6,0 \mu\text{mol/L}$) и куркумин ($\text{MBIC}_{50} = 24,84 \mu\text{mol/L}$), както е показано чрез количествено определяне на свързани в биофилм бактерии. В заключение, оценената антибактериална активност на еруфозин разширява спектъра на полезните му фармакологични ефекти, което е важно за клиничното му развитие. Установените синергични и адитивни комбинации могат да бъдат полезни за приложението на двата АРС в терапията на неоплазиите, тъй като много злокачествени заболявания са придружени от бактериални инфекции.

Ключови думи: мицеларен куркумин; милтефозин; еруфозин; антибактериална активност; *Staphylococcus aureus*; образуване на биофилм; лекарствени взаимодействия

Micellar curcumin improves the antibacterial activity of the alkylphosphocholines erufosine and miltefosine against pathogenic *Staphylococcus aureus* strains

Maya Margaritova Zaharieva, Alexander Dimitrov Kroumov, Lyudmila Dimitrova, Iva Tsvetkova, Antonios Trochopoulos, Spiro Mihaylov Konstantinov, Martin Reinhold Berger, Milena Momchilova, Krassimira Yoncheva & Hristo Miladinov Najdenski

Abstract

In the light of the emerging bacterial resistance to broad-spectrum antibiotics, the search for new antibacterial therapeutics and drug combinations is one of the most challenging topics nowadays. In the present study, we investigated for the first time the antibacterial and biofilm inhibitory effects of the third generation anticancer alkylphosphocholine (APC) erufosine against pathogenic *Staphylococcus aureus* strains in comparison to the prototype of this pharmacological class of drugs, miltefosine. We also searched for synergistic antibacterial combinations between both APCs and curcumin incorporated in copolymeric micelles based on Pluronic® P123 or a mixture of Pluronic® P123 and Pluronic® F127 (P123/F127). The obtained quantitative redoxactivity experimental data and drug–drug interactions were evaluated by using mathematical models in the MAPLE software. Similar to miltefosine, erufosine showed a moderate bacteriostatic effect in clinically relevant concentrations (50-60 $\mu\text{mol/L}$) and inhibited the redox activity of the treated bacteria up to 90% at minimal inhibitory concentrations. The effect of both APCs towards methicillin resistant staphylococci was enhanced by combinations with P123/F127 micellar CRM at a ratio of 1:1. Erufosine showed a stronger median biofilm inhibition at lower concentrations ($\text{MBIC}_{50}=1.87 \mu\text{mol/L}$) than miltefosine ($\text{MBIC}_{50}=6.0 \mu\text{mol/L}$) and curcumin ($\text{MBIC}_{50}=24.84 \mu\text{mol/L}$) as demonstrated by quantification of biofilm-bound bacteria. In conclusion, the estimated antibacterial activity of erufosine widens the spectrum of its useful pharmacological effects, which is important for its clinical development. The established synergistic and additive drug combinations could be beneficial for the application of both APCs in cancer therapy, since numerous malignancies are accompanied by bacterial infections.

Keywords: micellar curcumin; miltefosine; erufosine; antibacterial activity; *Staphylococcus aureus*; biofilm formation; drug interactions

Анти-херпес симплекс вирус и антибактериални активности на *Graptopetalum paraguayense* E. Walther: пилотно проучване

Мая Маргаритова Захариева, Петя Генова-Калу, Ивайла Динчева, Илиян Баджаков, Стефка Крумова, Венелин Енчев, Христо Найденовски и Надежда Маркова

Резюме

Graptopetalum paraguayense E. Walther (GP) принадлежи към семейство *Crassulaceae* и има няколко ползи за здравето. В настоящото проучване ние оценихме цитотоксичната, анти-херпес симплекс вирус (HSV) и антибактериалната активности на тотален екстракт от GP с метанол/вода. Резултатите от изследването на цитотоксичността на тествания екстракт показват широк концентрационен диапазон на клетъчна поносимост. GP екстрактът демонстрира значителен инхибиращ ефект върху дивия тип HSV-1 щам Victoria в концентрация 0,0001 mg/mL, равна на максималната нетоксична концентрация (с 97,5% защита на клетките). По отношение на резистентния на ацикловир мутант HSV-2 щам PU и див тип HSV-2 щам Bja, антивирусната активност и селективността на екстракта са много ниски, със стойности на EC₅₀ от 0,1 до 0,01 mg/mL, а индексът на селективност варира от 25 до 250, съответно. Екстрактът от GP проявява селективна инхибираща активност и върху растежа на Грам-положителни бактериални патогени, като *Staphylococcus aureus* е най-чувствителен. Освен това предотвратява образуването на MRSA биофилм до 50% при концентрация 1,6 mg/mL и до 90% при концентрация 2,5 mg/mL. Демонстрираните в нашето проучване антихерпесна и антибактериална активности вероятно са свързани с наличието на феноли и в частност на галова киселина. Антимикробната активност на екстракта от GP има бъдещото развитие като хранителна добавка на базата на *G. paraguayense* и следователно се налагат допълнителни изследвания за изолиране на биологично активни съединения или смеси от тях с последващо задълбочено проучване на техните анти-HSV и антибактериални механизми на действие.

Ключови думи: *Graptopetalum paraguayense*, екстракт от E. Уолтър; анти-HSV дейности; антибактериален ефект; минимална инхибиторна концентрация; ефективна концентрация 50% (EC₅₀); цитотоксичност

Anti-Herpes Simplex virus and antibacterial activities of *Graptopetalum paraguayense* E. Walther leaf extract: a pilot study

Maya Margaritova Zaharieva, Petia Genova-Kalou, Ivayla Dincheva, Ilian Badjakov, Stefka Krumova, Venelin Enchev, Hristo Najdenski & Nadezhda Markova

ABSTRACT

Graptopetalum paraguayense E. Walther (GP) belongs to the *Crassulaceae* family and has several health benefits. In the present study we evaluated the cytotoxic, anti-Herpes Simplex virus (HSV) and antibacterial activities of a total methanol/water GP extract. The results from the cytotoxicity investigation of the tested extract showed a high cell tolerable concentration range. The GP extract demonstrated a significant inhibitory effect on the wild-type HSV-1 strain Victoria in a concentration of 0.0001mg/mL equal to the maximal nontoxic concentration (with 97.5% protection of the cells). Regarding the acyclovir-resistant mutant HSV-2 strain PU and wild-type HSV-2 strain Bja, the antiviral activity and selectivity of the extract were very low, with EC₅₀ values from 0.1 to 0.01 mg/mL, and the selectivity index ranging from 25 to 250, respectively. The GP extract exhibited selective inhibitory activity also on the growth of Gram-positive bacterial pathogens, with *Staphylococcus aureus* being most sensitive. It also prevented the formation of MRSA biofilm up to 50% at a concentration of 1.6mg/mL and up to 90% at a concentration of 2.5mg/mL. The anti-herpetic and antibacterial activities demonstrated in our investigation are probably related to the presence of phenols, and in particular gallic acid. The antimicrobial activity of the GP extract holds a promise for the future development of nutrition supplements based on *G. paraguayense* and therefore warrants further studies aimed at isolating biologically active compounds or mixtures thereof with subsequent in-depth investigation of their anti-HSV and antibacterial mechanisms of action.

Keywords: *Graptopetalum paraguayense*, E. Walther extract; anti-HSV activities; anti-bacterial effect; minimal inhibitory concentration; effective concentration 50% (EC₅₀); cytotoxicity

**Липса на остра *in vivo* токсичност на етилацетатен екстракт
от надземни части на *Geum urbanum* L.
върху интестинална епителна тъкан и Пайерови плаки**

*Людмила Димитрова, Станислав Филипов, Мая Захариева,
Лилия Церовска, Галина Железова, Милена Попова,
Вася Банкова, Христо найденски*

Резюме

Geum urbanum L. (род *Geum*, семейство Rosaceae) е тревист многогодишен растителен вид, често известен като билката на св. Бенедикт и широко разпространен в умерените райони. Той се използва от древни времена в Европейската и по-специално в Българската традиционна медицина за лечение на стомашно-чревни заболявания, както и за намаляване на кървене и възпалителни плаки по лигавиците. Отвари и инфузии от надземни части, корени и коренища се препоръчват за лечение на диария, дизентерия, диспепсия, гастроентерит, левкорей, кръвоизливи, инфекции и треска. Въпреки дългата и широко разпространена употреба на различни извлекци от *G. urbanum* L. в традиционната медицина, малко се знае за токсикологичния профил на растението. Токсичността на екстрактите на активното растение е от критично значение за бъдещата им употреба като хранителни добавки с благоприятно въздействие срещу изброените по-горе заболявания. Основната цел на нашето проучване беше да се охарактеризира острата токсичност на етилацетатен екстракт, получен от въздушните части на *G. urbanum* L., относно ефектите му върху чревната епителна тъкан и пластирите на Пейер след 14-дневно приложение и като се вземат предвид изискванията за 3R. Патоморфологичната оценка на проби от тези тъкани доказва липсата на токсичен ефект в биологично активни концентрации. Нашите изследвания допринасят за по-добрата фармакологична характеристика на тествания екстракт и оценка на потенциала му за бъдещо развитие като хранителна добавка.

Ключови думи: етилацетатен екстракт от *Geum urbanum* L., остра *in vivo* токсичност, интестинална епителна тъкан, Пайерови плаки

Lack of Acute *in vivo* Toxicity of Ethyl Acetate Extract from Aerial Parts of *Geum urbanum* L. on Intestinal Epithelial Tissue and Peyer's Patches

*Lyudmila Dimitrova, Stanislav Philipov, Maya Zaharieva,
Lilia Tserovska, Galina Zhelezova, Milena Popova,
Vassya Bankova, Hristo Najdenski*

Abstract

Geum urbanum L. (genus *Geum*, family *Rosaceae*) is a herbaceous perennial plant species, commonly known as wood avens or St. Benedict's herb and widespread in temperate regions. It has been used since ancient times in the European and particularly in the Bulgarian traditional medicine for treating gastro-intestinal diseases as well as for reducing bleeding and inflammation sequelae in mucous membranes. Decoctions and infusions from the aerial parts, roots, and rhizomes were recommended for treatment of diarrhea, dysentery, dyspepsia, gastroenteritis, leucorrhoea, hemorrhages, infections, and fever. Despite the long and widespread use of different *G. urbanum* L. preparations in traditional medicine, little is known about the toxicological profile of the plant. The toxicity of the active plant's extracts is of critical significance for their future use as food additives with favourable effects against the diseases listed above. The main objective of our study was to characterize the acute toxicity of an ethyl acetate extract obtained from the aerial parts of *G. urbanum* L., regarding its effects on intestinal epithelial tissue and Peyer's patches after 14-day application and considering the 3R requirements. The pathomorphological evaluation of specimens from these tissues evidenced the lack of toxic effect in biologically active concentrations. Our findings contribute to the better pharmacological characterization of the tested extract and evaluation of its potential for future development as a food additive.

Keywords: Ethyl acetate extract of *Geum urbanum* L., acute *in vivo* toxicity, intestinal epithelial tissue, Peyer's patches

Приложение на сребърни антибактериални и противогъбични нанослоеове за покриване на очни протези

Красимир Коев, Николай Донков, Надя Станкова, Емил Моралийски, Христо Найденски, Тимерфаяз Нургалиев, **Мая Захариева** и Лъчезар Аврамов

Резюме

Статията анализира антибактериални и противогъбични свойства на покрити със Ag-Al₂O₃ нанослоеове, депозиранни от RF реактивен магнетрон, наслоени върху стъклени очни протези. Проучването е провокирано от необходимостта от потискане на инфекциите, причинени от патогенни микроорганизми след поставянето на очни протези. Това поражда идеята за образуване на протези на защитни покрития с антибактериални и противогъбични свойства. Елементният състав на повърхността и морфологичните характеристики на покритията са изследвани чрез XPS и SEM измервания. Освен това са проведени микробиологични изследвания за установяване на антибактериалното и антимикотично действие на нанокomпозитните Ag/Al₂O₃ слоеве срещу Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии и *Candida albicans*. Най-силното действие на слоевете се открива срещу *Pseudomonas aeruginosa* - пълна инактивация след 2 часа; *Escherichia coli* и *Candida albicans* - пълна инактивация след 5 часа; пълно инактивиране на *Staphylococcus aureus* след 24 часа. Експерименталните доказателства предполагат многообещаващо приложение на такива антибактериални и противогъбични Ag/Al₂O₃ нанослоеове за намаляване на очните инфекции при имплантиране на очни протези.

Ключови думи: очни протези, нанослоеове от Ag/Al₂O₃, антибактериално, антигъбично действие

Application of Silver Antibacterial and Antifungal Nanolayers for Ocular Prostheses Coating

Krassimir Koev, Nikolai Donkov, Nadya Stankova, Emil Moraliiski, Hristo Najdenski, Timerfayaz Nurgaliev, **Maya Zaharieva**, and Latchezar Avramov

Abstract

The paper reports on antibacterial and antifungal properties of Ag-doped Al₂O₃ nanolayers deposited by RF reactive magnetron sputtering on glass ocular prostheses. The study is provoked by the need of suppressing the infections caused by pathogenic microorganisms following the placement of ocular prostheses. This brings about the idea of forming protective coatings with antibacterial and antifungal properties on the prostheses. The surface elemental composition and the morphological characteristics of the coatings are investigated by XPS and SEM measurements. Further, the microbiological studies are conducted to establish the antibacterial and antifungal action of the nanocomposite Ag/Al₂O₃ layers against Gram-positive and -negative bacteria, and *Candida albicans*. The strongest action of the layers is found against *Pseudomonas aeruginosa* full inactivation after 2 h; *Escherichia coli* and *Candida albicans* – full inactivation after 5 h; *Staphylococcus aureus* full inactivation after 24 h. The experimental findings suggest a very promising application of such antibacterial and antifungal Ag/Al₂O₃ nanolayers regarding the reduction of eye infections when implanting ocular prostheses.

Keywords: eye prostheses, nanolayers of Ag/Al₂O₃, antibacterial, antifungal action

Аналитично изследване и антимикробна активност на алфа-дефензин 2, разрешено в фармакопейни буфери с различно рН

Мая Маргаритова Захаријева, Мери Наскова Америкова, Лили Антонова Андонова, Иванка Петкова Пенчева-Ел Тиби, Вания Николова Масларска И Христо Миладинов Найдeнски

Резюме

Човешките неутрофилни пептиди (HNP, алфа-дефензини) са група от шест дефензини, които се считат за нови антимикробни лекарства поради тяхната многофункционална ефективност срещу бактерии, вируси и гъбички. Независимо от уникалните биологични свойства, алфа-дефензините са нестабилни съединения и тяхната активност зависи от много физични и химични фактори, както и от вида на използваната среда за култивиране. Това води до затруднения в изследванията и препятствия при тяхното терапевтично приложение. Целта на това проучване беше да се определи антибактериалната активност на алфа-дефензин 2, разтворен във фармакопейни буфери, и паралелно да се разработят селективни и точни аналитични тестове за идентификация и анализ на алфа-дефензин 2 в хода на изследването. Антибактериалният ефект на алфа-дефензина 2 беше определен срещу щам *Escherichia coli* (ATCC 25922). Установено бе, че 10 mg/L човешки неутрофилен пептид-2 (HNP-2, алфа-дефенсин 2), разтворен в рН=9,0 буфер, предизвиква 90% инхибиране на бактериалната респираторна активност. Този буфер се счита за подходяща среда за проява на антибактериалната активност на алфа-дефензина. Разработен е селективен метод за анализ на MS за идентифициране на алфа-дефензин 2 в пробните смеси. Също така беше разработен HPLC метод с алтернативна селективност за идентифициране и анализ на смеси, съдържащи алфа-дефензин 2 и аминокиселини в Mueller Hinton бульон. Процедурата включва разработване на определяне на тест за годност на системата.

Ключови думи: рН, антимикробна активност, аналитично изследване, алфа-дефензин 2, буфери

Analytical study and antimicrobial activity of alpha-defensin 2 dissolved in pharmacopoeia buffers with different pH

Maya Margaritova Zaharieva, Meri Naskova Amerikova, Lily Antonova Andonova, Ivanka Petkova Pencheva-El Tibi, Vania Nikolova Maslarska And Hristo Miladinov Najdenski

Abstract

Human neutrophil peptides (HNPs, alpha-defensins) are a group of six defensins being considered as new antimicrobial drugs because of their multifunctional efficiency against bacteria, viruses and fungi. Regardless of the unique biological properties, alpha-defensins are unstable compounds and their activity depends on many physical and chemical factors as well as on the kind of the used cultivation media. This leads to research difficulties and obstructions in their therapeutic application. The purpose of this study was to determine the antibacterial activity of alpha-defensin 2 dissolved in pharmacopoeia buffers and in parallel to develop selective and accurate analytical tests for identification and assay of alpha-defensin 2 in the course of study. The antibacterial effect of alpha-defensin 2 was determined against the strain *Escherichia coli* (ATCC 25922). It was found that 10 mg/L of Human neutrophil peptide-2 (HNP-2, alpha-defensin 2) dissolved in pH 9.0 buffer caused 90% inhibition of the bacterial respiratory activity. This buffer was considered as a suitable environment for deploying the antibacterial activity of the alpha-defensin. A selective MS analysis method for the identification of alpha-defensin 2 in sample mixtures was developed. Also, the HPLC method with alternative selectivity was elaborated for identification and assay of mixtures containing alpha-defensin 2 and aminoacids in Mueller Hinton broth. The procedure includes development of system suitability test determination.

Keywords: pH, antimicrobial activity, analytical study, alpha-defensin 2, buffers