

Резюмета на научни публикации на английски и български, съгласно минималните национални критерии по ЗРАСРБ и допълнителните изисквания на ИМикБ-БАН

на доц. д-р Милен И. Георгиев

конкурс за академична длъжност „професор“, по направление 5.11. Биотехнологии (Технология на биологично активните вещества) за нуждите на Департамент „Биотехнология“, Лаборатория по метаболомика

По растителни биотехнологии

Zhang K., Logacheva M.D., Meng Y., Hu J., Wan D., Li L., Janovska D., Wang Z., Georgiev M.I., Yu Z., Yang F., Yan M.*, Zhou M.* (2018) Jasmonate-responsive MYB factors spatially repress bioactive rutin biosynthesis in *Fagopyrum tataricum*. *Journal of Experimental Botany*, 69(8): 1955-1966 (ИФ₂₀₁₈ 5.36; Q1).

Abstract: Jasmonates are plant hormones that induce the accumulation of many secondary metabolites, such as rutin in buckwheat, via regulation of jasmonate-responsive transcription factors. Here, we report on the identification of a clade of jasmonate-responsive subgroup 4 MYB transcription factors, FtMYB13, FtMYB14, FtMYB15, and FtMYB16, which directly repress rutin biosynthesis in *Fagopyrum tataricum*. Immunoblot analysis showed that FtMYB13, FtMYB14, and FtMYB15 could be degraded via the 26S proteasome in the COI1-dependent jasmonate signaling pathway, and that this degradation is due to the SID motif in their C-terminus. Yeast two-hybrid and bimolecular fluorescence complementation assays revealed that FtMYB13, FtMYB14, and FtMYB15 interact with the importin protein Sensitive to ABA and Drought 2 (FtSAD2) in stem and inflorescence. Furthermore, the key repressor of jasmonate signaling FtJAZ1 specifically interacts with FtMYB13. Point mutation analysis showed that the conserved Asp residue of the SID domain contributes to mediating protein-protein interaction. Protoplast transient activation assays demonstrated that FtMYB13, FtMYB14, and FtMYB15 directly repress phenylalanine ammonia lyase (*FtPAL*) gene expression, and FtSAD2 and FtJAZ1 significantly promote the repressing activity of FtMYBs. These findings may ultimately be promising for further engineering of plant secondary metabolism.

Резюме: Жасмонатите са растителни хормони, които индуцират акумулирането на голям брой вторични метаболити – като рутин в елда например – чрез регулиране на жасмонат-отговарящи транскрипционни фактори. В това изследване е идентифициран клон от жасмонат-отговарящи S4 R2R3-MYB транскрипционни фактори, в това число FtMYB13, FtMYB14, FtMYB15 и FtMYB16, които директно инхибират биосинтеза на рутин във *Fagopyrum tataricum*. Чрез имуноблот анализи е доказано, че FtMYB13, FtMYB14 и FtMYB15 могат да се разградят чрез 26S протеазоми в COI1-зависимия сигнален път и че тази деградация се дължи на SID мотива в техния C-терминален край. Освен това, дрождевите двуhibридни и бимолекулярни флуоресцентни комплементарни изследвания показват, че FtMYB13, FtMYB14 и FtMYB15 взаимодействат с протеина импортин, който е чувствителен към абсцисиновата киселина (ABA) и Drought 2 (FtSAD2) в стеблото и съцветието. FtSAD2 взаимодейства директно с гореизброените транскрипционни фактори и посредници за транспорта на тези репресори в ядрата на клетките в стеблата и съцветията. От своя страна ключовия супресор на жасмонат сигнализацията, а именно FtJAZ1 се свързва специфично с FtMYB13 и подпомага инхибиращата му активност най-вече в стеблата, листата и

съцветията. FtMYB16 действа като специфичен рецептор, който зависи от EAR мотива в корените, докато инхибиращата активност на FtMYB13, FtMYB14 и FtMYB15 се дължи на консервативния Asp остатък на SID домейна, което е доказано чрез т.нар. точкови мутации. При изследванията свързани с протопласт преходното активиране се установява, че FtMYB13, FtMYB14 и FtMYB15 директно потискат генната експресия на фенилаланин амоняк лиазата (*FtPAL*), а FtSAD2 и FtJAZ1 стимулират значително инхибиращата активност на FtMYB транскрипционните фактори. Тези резултати дават основите на важно молекулярно познание, което може да бъде използвано за метаболитно манипулиране на вторичния метаболизъм в растенията.

Hidalgo D., Georgiev M.I., Marchev A., Bru-Martinez R., Cusido R.M., Corchete P., Palazon J.* (2017) Tailoring tobacco hairy root metabolism for the production of stilbenes. *Scientific Reports*, 7: 17976 (ИФ₂₀₁₇ 4.122; Q1).

Abstract: Tobacco hairy root (HR) cultures, which have been widely used for the heterologous production of target compounds, have an innate capacity to bioconvert exogenous *t*-resveratrol (*t*-R) into *t*-piceatannol (*t*-Pn) and *t*-pterostilbene (*t*-Pt). We established genetically engineered HR carrying the gene encoding stilbene synthase (STS) from *Vitis vinifera* and/or the transcription factor (TF) AtMYB12 from *Arabidopsis thaliana*, in order to generate a holistic response in the phenylpropanoid pathway and coordinate the up-regulation of multiple metabolic steps. Additionally, an artificial microRNA for chalcone synthase (amiRNA CHS) was utilized to arrest the normal flux through the endogenous chalcone synthase (CHS) enzyme, which would otherwise compete for precursors with the STS enzyme imported for the flux deviation. The transgenic HR were able to biosynthesize the target stilbenes, achieving a production of 40 µg/L of *t*-R, which was partially metabolized into *t*-Pn and *t*-Pt (up to 2.2 µg/L and 86.4 µg/L, respectively), as well as its glucoside piceid (up to 339.7 µg/L). Major metabolic perturbations were caused by the TF AtMYB12, affecting both primary and secondary metabolism, which confirms the complexity of biotechnological systems based on seed plant *in vitro* cultures for the heterologous production of high-value molecules.

Резюме: Трансформирани коренови култури от тютюн, широко използвани за хетероложна продукция на целеви метаболити, имат естествен капацитет за биоконверсия на външно добавен *t*-ресвератрол в *t*-пицеатанол и *t*-птеростилбен. В това изследване са получени генетично модифицирани трансформирани коренови култури, носители на ген, кодиращ стилбен синтаза от *Vitis vinifera* и/или транскрипционен фактор AtMYB12 от *Arabidopsis thaliana*, с цел да се генерира холистичен отговор във фенилпропаноидния път и да се координира активирането на няколко метаболитни стъпала едновременно. В допълнение на това е използвана микроРНК изкуствен аналог на халкон синтаза, която блокира конкурентните биосинтетични пътища, чрез въздействие върху вътреклетъчната халкон синтаза. Халкон синтазата е ензим, който се конкурира за използването на предшественици със стилбен синтазата. Трансгенните коренови култури синтезират целевите стилбени, достигайки до продуцирането на 40 µg/L *t*-ресвератрол, който се метаболизира частично до *t*-пицеатанол и *t*-птеростилбен (до 2.2 µg/L и 86.4 µg/L, съответно), а също така и до неговия гликозид пицеид (339.7 µg/L). Основните „метаболитни смущения“ са предизвикани от транскрипционния фактор AtMYB12, който засяга както първичния, така и вторичния метаболизъм. Получените резултати потвърждават комплексността при регулирането на биосинтеза на вторични метаболити в растителните *in vitro* системи с цел биопродукция на ценни молекули.

Charoonratana T., Wungsintaweekul J.*, Pathompak P., Georgiev M.I., Choi Y.H., Verpoorte R. (2013) Limitation of mitragynine biosynthesis in *Mitragyna speciosa* (Roxb.) Korth. through tryptamine availability. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 68: 394-405 (ИФ₂₀₁₃ 0.569; Q4).

Abstract: Metabolite profiles of *Mitragyna speciosa* were determined by means of ¹H NMR-based and HPLC-based analyses. The results indicated that high contents of secologanin, caffeic acid, gallic acid, epigallocatechin, and mitragynine were accumulated in leaves. In *M. speciosa*, feedings of tryptamine, tryptophan, phenylalanine or tyrosine significantly increased the mitragynine contents. Feedings of tryptamine and loganin also enhanced the mitragynine accumulation, but feeding of loganin only did not affect the mitragynine level. The mRNA levels of anthranilate synthase alpha subunit (ASA), tryptophan decarboxylase (TDC), and strictosidine synthase (STR) were measured by quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) in control plants and those exposed to methyl jasmonate (MJ; 10 μM). All genes responded to MJ after a 24-h treatment. The mitragynine contents were also enhanced and corresponded to the transcript levels. From the present results we conclude that a high content of secologanin together with a undetectable level of tryptamine in *M. speciosa* feature the limitation of mitragynine biosynthesis. Additionally, expression of all the genes limits production of an essential precursor for mitragynine production.

Резюме: Изследван е метаболитния профил на *Mitragyna speciosa* чрез ядрено-магнитен резонанс и високо ефективна течна хроматография. Резултатите показват високо съдържание на секологанин, епигалокатехин, кафеена и галова киселина, а също така и митрагинин в листата на растението. При използването на предшественици, като триптамин, триптофан, фенилаланин или тирозин се повишава значително съдържанието на митрагинин. Подхранването с триптамин и логанин също повишава акумулирането на митрагинин, но използването на логанин самостоятелно не повлиява акумулирането му. Нивата на мРНК на алфа под-единицата на антранилат синтазата, триптофан декарбоксилазата и стриктозидин синтазата са измерени чрез количествена полимеразна верижна реакция в реално време (RT-qPCR) в контролни растения и растения третирани с метилжасмонат (10 μM). След 24 часа третиране с метилжасмонат са активирани всички гени, което води до повишеното съдържание на митрагинин и кореспондира на ниво транскрипция. От настоящето проучване може да се направи заключението, че високото съдържание на секологанин заедно с недетектируемите стойности на триптамин в *M. speciosa* са характерни при инхибирането на биосинтеза на митрагинин. В допълнение, експресията на всички тези гени лимитира синтеза на есенциални прекурсори в продукцията на митрагинин.

Georgiev M.I.*, Ludwig-Mueller J., Alipieva K., Lippert A. (2011) Sonication-assisted *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. for bioactive metabolite accumulation. *Plant Cell Reports*, 30: 859-866 (ИФ₂₀₁₁ 2.274; Q2).

Abstract: An efficient protocol for the establishment of transformed root culture of *Verbascum xanthophoeniceum* using sonication-assisted *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation is reported. Only 10 days after the inoculation with *A. rhizogenes* ATCC 15834 and 45 s ultrasound exposure, hairy roots appeared on 75% of the *Verbascum* leaves. Ten hairy root lines were isolated, although only half of them were free of bacterial contamination and started growing when excised from mother explants. The transgenic nature of the most vigorously growing hairy root clones (VX1 and VX6) was confirmed by polymerase chain reaction. Under submerged cultivation both hairy root clones accumulated high

biomass amounts (12.8 and 14.3 g/L, respectively) and significant amounts of bioactive phenylethanoid glycoside verbascoside (over 6-times more than in mother plant leaves). LC-APCI-MS analyses confirmed verbascoside accumulation in hairy root clones along with three other phenylethanoid glycosides (forsythoside B, leucosceptoside B and martynoside) and an iridoid glycoside aucubin. This is the first report on the induction of hairy roots of *Verbascum* plants.

Резюме: Представен ефективен протокол за инициране на трансформирани коренови култури от *Verbascum xanthophoeniceum* чрез прилагането на *Agrobacterium rhizogenes* генетична трансформация и третиране с ултразвук на растителните експланти. Десет дни след инокулиране с *A. rhizogenes* ATCC 15834 и третиране с ултразвук от 45 секунди, се наблюдава появата на корени в 75% от растителните експланти. Трансгенния характер на най-интензивно растящите коренови линии (VX1 и VX6) е потвърден чрез полимеразна верижна реакция. При дълбочинно култивиране и двете коренови линии натрупват високи количества на биомаса (12.8 и 14.3 g/L) и значителни количества от фенолетаноидния гликозид вербаскозид (повече от 6 пъти, отколкото в листата на растението). Анализите извършени с течна хроматография комбинирана с химическа йонизация при атмосферно налягане и мас спектрометрия (LC-APCI-MS) потвърждават съдържанието на вербаскозид (основния вторичен метаболит), както и на три други фенолетаноидни гликозиди в трансформирани корени (форситозид В, леукосептозид В и мартинозид) и иридоидния гликозид аукубин, което показва, че тези култури имат голям потенциал за промишлено получаване на вербаскозид в бъдеще. Това е първото съобщение за индуцирането на трансформирани коренови култури на растения от род *Verbascum*.

Georgiev M.I.*, Ludwig-Mueller J., Weber J., Stancheva N., Bley Th. (2011) Bioactive metabolites production and stress-related hormones in devil's claw cell suspension cultures grown in bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89: 1683-1691 (**ИФ**₂₀₁₁ **3.425; Q1**).

Abstract: In a previous report, we showed that cell cultures of *Harpagophytum procumbens*, a South African plant with high medicinal value, accumulate high amounts of anti-inflammatory phenylethanoid glycosides during cultivation in shake-flasks. The aim of the present study was to transfer the phenylethanoid biosynthetic process to a 3-L stirred tank reactor and a 1-L glass-column bioreactor (operated with pulsed aeration). We found that, with stepwise increases in aeration, the stirred tank reactor yielded similar productivities of verbascoside (the major phenylethanoid glycoside in the cells) to those reported for shake-flask cultures (55.68 vs. 54.78 mg verbascoside/L/day, respectively). Transfer in the pulse-aerated column reactor resulted in 165.42 mg verbascoside/L/day, one of the highest yields reported to date. Further, to evaluate the physiological status of the suspended cells in the bioreactors cultures, we examined their hormone levels and compared them to those of cells in shake-flask cultures. While indole-3-acetic acid levels did not differ significantly between the bioreactor and shake-flask cultures, there were considerable differences in their levels of abscisic, jasmonic, and salicylic acids. These results are discussed with respect to relative stress levels in the different cultivation systems.

Резюме: Клетъчни култури от *Harpagophytum procumbens* (южноафриканско растение с голяма медицинска стойност) натрупват високи количества фенолетаноидни гликозиди с противовъзпалително действие при култивиране в колби. Целта на изследването е трансфер на процеса на биосинтез на фенолетаноиди в 3-L биореактор с механично

разбъркване и 1-L стъклен колонен биореактор (работещ с пулсова аерация). Установено е, че стъпаловидното повишаване на аерацията в биореактора с механично разбъркване води до добив на вербаскозид (мажорния фенилетаноиден гликозид в клетките) в количества близки до тези при култивиране, проведено в колби (55.68 спрямо 54.78 mg вербаскозид/L/ден, съответно). Трансферът в пулсационно-аерирания колонен биореактор води до натрупването на 165.42 mg вербаскозид/L/ден, един от най-високите добиви докладван до сега. В последствие е изследван физиологичния статус на суспензионната култура в биореакторите, чрез анализ на нивата на хормоните в нея и сравнение с клетките, култивирани в колби. Докато количествата на индол-3-оцетната киселина в клетките не се различава между култивирането в колби и биореактор, то се наблюдават значителни разлики в нивата на абсцисиновата, жасмоновата и салициловата киселини. Тези резултати се дължат на относително различните нива на стрес в различните култивационни системи.

Marchev A., Yordanova Zh., **Georgiev M.I.*** (2018) Transformed root culture: from genetic transformation to NMR-based metabolomics. In: *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology, vol. 1815* (Loyola-Vargas V.M., Ochoa-Alejo N., Eds.), pp. 457-474, ISBN: 978-1-4939-8593-7.

Abstract: Hairy root (HR) culture is considered as “green factory” for mass production of bioactive molecules with pharmaceutical relevance. As such, HR culture has an immense potential as a valuable platform to elucidate biosynthetic pathways and physiological processes, generate recombinant therapeutic proteins, assist molecular breeding, and enhance phytoremediation efforts. However, some plant species appear recalcitrant to the classical *Agrobacterium rhizogenes* transformation techniques. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation (SAArT) is a highly effective method to deliver bacteria to target plant tissues that includes exposure of the explants to short periods of ultrasound in the presence of the bacteria.

Nuclear magnetic resonance (NMR)-based metabolomics is one of the most powerful and suitable platforms for identifying and obtaining structural information on a wide range of compounds with a high analytical precision. In terms of plant science, NMR metabolomics is used to determine the phytochemical variations of medicinal plants or commercial cultivars in certain environments and conditions, including biotic stress and plant biotic interaction, structural determination of natural products, quality control of herbal drugs or dietary supplements, and comparison of metabolite differences between plants and their respective in vitro cultures.

In this chapter, we attempt to summarize our knowledge and expertise in induction of hairy roots from rare and recalcitrant plant species by SAArT technique and further methodology for extraction of secondary metabolites of moderate to high polarity and their identification by using NMR-based metabolomics.

Резюме: Трансформиранияте коренови култури се приемат като „зелена фабрика“ за производство на фармацевтично значими биологично-активни вещества. Като такива, кореновите култури притежават огромен потенциал като платформа за проучване на биосинтетични пътища и физиологични процеси, производството на рекомбинантни протеини, подпомагане на молекулярното размножаване и улесняване усилията в посока на фиторемедиацията. Някои растителни видове не са податливи на класическите техники за трансформация с *Agrobacterium rhizogenes*. Ултразвук-подпомогнатата *Agrobacterium*-опосредствана трансформация (УПArT) е високо

ефективен метод за въвеждане на бактерията в растителната тъкан, която включва ултразвукова експозиция на експланта за кратки интервали в присъствие на бактерията.

Метаболомният анализ базиран на ядрено магнитен резонанс (ЯМР) е един от най-мощните и удачни подходи за идентифициране и извличане на информация за структурата на широк спектър от съединения с висока аналитична точност. По отношение на растителните изследвания, ЯМР-базираната метаболомика се използва за определяне на разлики в химичния състав на лечебните растения или комерсиални сортове култури в различни условия, включително биотичен стрес и растителни биотични взаимодействия, структурен анализ на природни продукти, качествен контрол на растителни лекарствени средства или хранителни добавки, и сравняване на метаболитния профил между растенията и техни *in vitro* култури.

В тази глава, са обобщени знанията и опита ни в индуциране на трансформирани коренови култури от редки и неподатливи растителни видове чрез УПАрТ, както и методология за екстракция на вторични метаболити със средна до висока полярност и последващото им идентифициране чрез ЯМР-базирана метаболомика.

Shi M., Liao P., Nile S.H., **Georgiev M.I.***, Kai G.* (2020) Biotechnological exploration of transformed root culture for value-added products. *Trends in Biotechnology*, DOI: 10.1016/j.tibtech.2020.06.012 (**ИФ₂₀₁₉ 14.343; Q1**).

Abstract: Medicinal plants produce valuable secondary metabolites with anticancer, analgesic, anticholinergic or other activities, but low metabolite levels and limited available tissue restrict metabolite yields. Transformed root cultures, also called hairy roots, provide a feasible approach for producing valuable secondary metabolites. Various strategies have been used to enhance secondary metabolite production in hairy roots, including increasing substrate availability, regulating key biosynthetic genes, multigene engineering, combining genetic engineering and elicitation, using transcription factors (TFs), and introducing new genes. In this review, we focus on recent developments in hairy roots from medicinal plants, techniques to boost production of desired secondary metabolites, and the development of new technologies to study these metabolites. We also discuss recent trends, emerging applications, and future perspectives.

Резюме: Лечебните растения произвеждат ценни вторични метаболити, притежаващи противораков, аналгетичен, антихолинергичен или други ефекти, но ниските им нива и ограниченото разпространение в определени растителни тъкани затруднява техния добив. Трансформирани коренови култури, наречени още hairy roots, осигуряват практически приложим подход за добив на ценни вторични метаболити. Разнообразни стратегии са изпробвани с цел увеличаване на добива на вторични метаболити при трансформирани коренови култури, включително увеличаване на концентрацията на субстрати за получаването, регулиране на ключови гени, важни за биосинтеза, мултигенно и комбинативно генно инженерство, елиситиране, използване на транскрипционни фактори и въвеждане на нови гени. В този обзор акцентираме върху последните разработки на коренови култури от лечебни растения, техники за усиляне на производството на желаните вторични метаболити и развитие на нови методи за тяхното изучаване. Освен това обсъждаме актуални тенденции, обещаващи приложения и бъдещи перспективи.

Marchev A.S., Yordanova Z.P., **Georgiev M.I.*** (2020) Green (cell) factories for advanced production of plant secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(4): 443-458 (ИФ₂₀₁₉ 8.108; Q1).

Abstract: For centuries plants have been intensively utilized as reliable sources of food, flavoring, agrochemical and pharmaceutical ingredients. However, plant natural habitats are being rapidly lost due to climate change and agriculture. Plant biotechnology offers a sustainable method for the bioproduction of plant secondary metabolites using plant *in vitro* systems. The unique structural features of plant-derived secondary metabolites, such as their safety profile, multi-target spectrum and “metabolite likeness,” have led to the establishment of many plant-derived drugs, comprising approximately a quarter of all drugs approved by the Food and Drug Administration and/or European Medicinal Agency. However, there are still many challenges to overcome to enhance the production of these metabolites from plant *in vitro* systems and establish a sustainable large-scale biotechnological process. These challenges are due to the peculiarities of plant cell metabolism, the complexity of plant secondary metabolite pathways, and the correct selection of bioreactor systems and bioprocess optimization. In this review, we present an integrated overview of the possible avenues for enhancing the biosynthesis of high-value marketable molecules produced by plant *in vitro* systems. These include metabolic engineering and CRISPR/Cas9 technology for the regulation of plant metabolism through overexpression/repression of single or multiple structural genes or transcriptional factors. The use of NMR-based metabolomics for monitoring metabolite concentrations and additionally as a tool to study the dynamics of plant cell metabolism and nutritional management is discussed here. Different types of bioreactor systems, their modification and optimal process parameters for the lab- or industrial-scale production of plant secondary metabolites are specified.

Резюме: От векове растенията се използват интензивно като устойчив източник за храна, овкусители, агрохимикали и фармацевтични молекули. Широката употреба на растенията в селското стопанство и промените в климата водят до изчерпване на естествените находища на ценни растения. Растителните биотехнологии предлагат надежден метод за биопродукция на растителни вторични метаболити чрез използване на растителни *in vitro* системи. Уникалните структурни характеристики на растителните вторични метаболити, като добър профил на безопасност, широк спектър и сходство с естествени метаболити, са довели до създаване на голям брой лекарства, основани на растителни молекули, представляващи около една четвърт от общия лекарствен пазар на одобрените от американската и европейската агенции по лекарства. Въпреки това все още има много трудности за преодоляване, за да се увеличи добива на тези метаболити в *in vitro* растителни култури и за създаване на устойчив едромашабен биотехнологичен процес. Тези предизвикателства се основават на особеностите в метаболизма на растителната клетка, сложността на биосинтетичните пътища на растителните метаболити и спецификата при избор на вида на биореактор и оптимизирането на целия процес. В настоящия обзор представяме интегрирано обобщение на възможните нови посоки в подпомагане на биосинтеза на ценни и потенциално търсени на пазара молекули в растителни *in vitro* култури. Това включва приложението на метаболитно инженерство и CRISPR/Cas9 метода за регулиране на растителния метаболизъм чрез свръхекспресия/репресия на единични или група от структурни гени или транскрипционни фактори. Използването на ЯМР-базираната метаболомика за проследяване концентрацията на метаболитите и допълнително като инструмент за изучаване динамиката на растително-клетъчният метаболизъм са обсъдени. Описани са различните типове биореакторни системи, възможностите за

модифицирането им и оптималните параметри за лабораторно или индустриално производство на вторични растителни метаболити.

Alipieva K.*, Korkina L., Erdogan Orhan I., **Georgiev M.I.** (2014) Verbascoside – A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnology Advances*, 32: 1065-1076 (**ИФ₂₀₁₄ 9.015; Q1**).

Abstract: Phenylethanoid glycosides are naturally occurring water-soluble compounds with remarkable biological properties that are widely distributed in the plant kingdom. Verbascoside is a phenylethanoid glycoside that was first isolated from mullein but is also found in several other plant species. It has also been produced by *in vitro* plant culture systems, including genetically transformed roots (so-called ‘hairy roots’). Verbascoside is hydrophilic in nature and possesses pharmacologically beneficial activities for human health, including antioxidant, anti-inflammatory and antineoplastic properties in addition to numerous wound-healing and neuroprotective properties. Recent advances with regard to the distribution, (bio)synthesis and bioproduction of verbascoside are summarised in this review. We also discuss its prominent pharmacological properties and outline future perspectives for its potential application.

Резюме: Фенилетаноидните гликозиди са естествено разпространени водно-разтворими съединения, притежаващи забележителни свойства и са широко разпространени в растителното царство. Вербаскозидът е фенилетаноиден гликозид изолиран за първи път от лопен, но се открива и в някои други растителни видове. Молекулата се синтезира също и чрез растителни *in vitro* култури, включително и генетично трансформирани коренови култури, т.нар. “hairy roots”. Вербаскозидът е с хидрофилна природа и притежава фармакологични ефекти върху здравето на човека, като антиоксидантен, противовъзпалителен и антинеопластичен, както и, рано-здравяващи и невропротективни свойства. Обобщени са последни данни за неговото разпространение в растителния свят и напредъкът по отношение нововъведенията за неговия (био)синтез и биопродукция. Известните до сега фармакологични свойства са разгледани и бъдещите възможности за приложението му са отбелязани.

Georgiev M.I.*, Weber J. (2014) Bioreactors for plant cells: hardware configuration and internal environment optimization as tools for wider commercialization. *Biotechnology Letters*, 36: 1359-1367 (**ИФ₂₀₁₄ 1.591; Q3**).

Abstract: Mass production of value-added molecules (including native and heterologous therapeutic proteins and enzymes) by plant cell culture has been demonstrated as an efficient alternative to classical technologies [i.e. natural harvest and chemical (semi)synthesis]. Numerous proof-of-concept studies have demonstrated the feasibility of scaling up plant cell culture-based processes (most notably to produce paclitaxel) and several commercial processes have been established so far. The choice of a suitable bioreactor design (or modification of an existing commercially available reactor) and the optimization of its internal environment have been proven as powerful tools toward successful mass production of desired molecules. This review highlights recent progress (mostly in the last 5 years) in hardware configuration and optimization of bioreactor culture conditions for suspended plant cells.

Резюме: Едромашабното производство на ценни молекули (включително нативни и хетероложни протеини и ензими) с помощта на растителни клетъчни култури е доказано като ефективна алтернатива на класическите технологии [като култивиране на растителния източник и химически (полу)синтез]. Голям брой доказателствени проучвания потвърждават възможността за мащабиране на растително-клетъчно базираните процеси (в най-голяма степен за производство на паклитаксел), както и няколко разработени производствени процеса с търговско приложение. Изборът на подходящ тип биореактор (или подобряването на вече наличен) и оптимизирането условията на вътрешната му среда са доказани начини за подобряване производството на целевите метаболити. В настоящия обзор се акцентира върху напредъка (в рамките на последните 5 години) в подобренията по отношение на условията на култивиране в биореактора при работа със суспендирани растителни клетки.

Georgiev M.I.*, Agostini E., Ludwig-Mueller J., Xu J. (2012) Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource. *Trends in Biotechnology*, 30(10): 528-537 (ИФ₂₀₁₂ 9.66; Q1).

Abstract: Hairy root syndrome is a disease that is induced by *Agrobacterium rhizogenes* infection and characterized by a proliferation of excessively branching roots. However, in the past 30 years *A. rhizogenes*-mediated transformation has also provided a valuable platform for studying biosynthesis pathways in plants. Furthermore, the genetically transformed root cultures are becoming increasingly attractive, cost-effective options for mass-producing desired plant metabolites and expressing foreign proteins. Numerous proof-of-concept studies have demonstrated the feasibility of scaling up hairy root-based processes while maintaining their biosynthetic potential. Recently, hairy roots have also shown immense potential for applications in phytoremediation, that is, plant-based decontamination of polluted environments. This review highlights recent progress and limitations in the field, and outlines future perspectives for the industrial exploitation of hairy roots.

Резюме: “Hairy root” синдромът е заболяване причинено от заразяване с *Agrobacterium rhizogenes* и се характеризира с разрастване на прекомерно разклонени корени. В последните 30 години *A. rhizogenes*-опосредстваното трансформиране предоставя ценна възможност за изучаване биосинтетичните пътища в растенията. Още повече, генетично трансформираните коренови култури се превръщат в привлекателна, икономически изгодна алтернатива за мащабно производство на желаните растителни метаболити и експресиране на чужди протеини. Голям брой доказателствени проучвания илюстрират възможността за мащабиране на базирани на трансформираните коренови култури процеси, при които е запазен биосинтетичният потенциал на културата. В последно време трансформираните коренови култури също показват голям потенциал за приложението им във фиторемедиацията, което представлява пречистване на замърсената околна среда с помощта на растенията. Настоящият обзор акцентира върху последните нововъведения и възникнали ограничения в областта и акцентира върху бъдещите възможности за промишлена употребата на кореновите култури.

Georgiev M.I.*, Weber J., Maciuk A. (2009) Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83: 809-823 (ИФ₂₀₀₉ 2.896; Q2).

Abstract: More than a century has passed since the first attempt to cultivate plant cells in vitro. During this time, plant cell cultures have become increasingly attractive and cost-effective alternatives to classical approaches for the mass production of plant-derived metabolites. Furthermore, plant cell culture is the only economically feasible way of producing some high-value metabolites (e.g., paclitaxel) from rare and/or threatened plants. This review summarizes recent advances in bioprocessing aspects of plant cell cultures, from callus culture to product formation, with particular emphasis on the development of suitable bioreactor configurations (e.g., disposable reactors) for plant cell culture-based processes; the optimization of bioreactor culture environments as a powerful means to improve yields; bioreactor operational modes (fed-batch, continuous, and perfusion); and biomonitoring approaches. Recent trends in downstream processing are also considered.

Резюме: Първият опит за *in vitro* култивиране на растителни клетки е проведен преди повече от век. От тогава растителните клетъчни култури стават все по-привлекателна и икономически-ефективна алтернатива на класическите подходи за мащабно производство на метаболити от растителен произход. Освен това, растителните клетъчни култури са единственият икономически устойчив начин за производство на някои ценни метаболити (напр. паклитаксел) от редки и/или застрашени растителни видове. Този обзор обобщава напредъка в последните години в производствените аспекти на растителните клетъчни култури, от калусни култури до получаване на продукт с практическа насоченост към оптимизирането на устройството на биореактора (напр. биореактори за еднократна употреба) за работа с растителни клетъчни култури; оптимизирането на културалната среда като основен подход за подобряване на добива; операционен модел на биореактора (периодично култивиране, непрекъснато култивиране и перфузионно) както и подходи за биомониторинг. Съвременните тенденции в етапите на пречистване също са разгледани.

По химия на природните молекули (вкл. метаболомика и метаболитно профилиране)

Marchev A.S.*, Koycheva I.K., Aneva I.Y., **Georgiev M.I.** (2020) Authenticity and quality evaluation of different *Rhodiola* species and commercial products based on NMR-spectroscopy and HPLC. *Phytochemical Analysis*, DOI: 10.1002/pca.2940 (**ИФ**₂₀₁₉ **2.772**; **Q1**).

Abstract: Introduction: The main concern regarding the authenticity and quality of *Rhodiola rosea* L. (*Sedum rosea* (L.) Scop.) products is their adulteration with other *Rhodiola* species.

Objective: The aim of the study was the development of a reliable and practical analytical platform for quality and quantity assessment of the characteristic molecules in three *Rhodiola* species (*R. rosea*, *R. kirilowii* (Regel) Maxim and *R. crenulata* (Hook. f. & Thomson) H. Ohba), commercial products and their possible application as markers for the authentication of *R. rosea* based products.

Material and Methods: The major molecules were identified by one-dimensional (1D) and two-dimensional (2D) nuclear magnetic resonance (NMR)-based metabolomics and quantitatively determined by high-performance liquid chromatography ultraviolet (HPLC-UV) analysis. The orthogonal projections to latent structures discriminant analysis (OPLS-DA) revealed the specific patterns in the metabolite profiles of *R. rosea* and *R. crenulata*. Results: The coumarin crenulatin was only identified in *R. crenulata* and can be used as a marker to detect potential adulteration of the commercial products. Crenulatin was identified in two of the four analysed products by NMR-spectroscopy. According to the HPLC data, in

less than a quarter of all products, the labelled amounts of salidroside and total rosavins were confirmed.

Conclusions: The developed analytical platform was found to be useful in the investigations of the phytochemical diversity of different *Rhodiola* species, the recognition of the unique metabolites between them and the identification of adulterated products. Therefore, this approach could be applied from the earliest to the latest stages of the value chain in the manufacturing of *R. rosea* based products.

Резюме: Основният проблем свързан с автентичността и качеството на търговски продукти от *Rhodiola rosea* L. (*Sedum rosea* (L.) Scop.) е тяхното фалшифициране с други видове *Rhodiola*. За целта е разработена надеждна и практична аналитична платформа за качествена и количествена оценка на характерните молекули в три вида *Rhodiola* (*R. rosea*, *R. kirilowii* (Regel) Maxim и *R. crenulata* (Hook. f. & Thomson) H. Ohba) и в търговски препарати, както и възможното приложение на тези молекули като маркери за автентичност на търговски препарати на база *R. rosea*. Основните молекули (*p*-тирозол, салидрозид, розавин, розин и розарин) са идентифицирани чрез използването на едно- и двуменционна метаболомика, базирана на ядрено-магнитния резонанс, съчетана с количествено определяне чрез високо ефективна течна хроматография с UV/VIS детекция. Дискриминационен анализ на ортогоналната проекция на латентните структури е използван за определяне на специфичните характеристики в метаболитния профил на *R. rosea* и *R. crenulata* (която се използва най-често за фалшифициране на търговски продукти на база *R. rosea*). Кумаринът кренулатин е идентифициран единствено в *R. crenulata* и може да бъде използван като маркер за детекция на потенциално фалшифициране на търговски продукти. Данните показват, че в по-малко от една четвърт от анализиранияте продукти е потвърдено съдържанието на салидрозид и розавини в тях спрямо съдържанието им, обявено на етикета. Разработената аналитична платформа е полезна за изследване на разликата във фитохимичния състав на различни видове *Rhodiola*, разпознаването на уникалните метаболити между тях и идентификацията на фалшифицирани продукти. Следователно, този подход може да се използва още от най-раните етапи на производство при окачествяване на входящите суровини до последните етапи от производството на търговските продукти.

Sieniawska E.*, Sawicki R., Golus J., **Georgiev M.I.** (2020) Untargeted metabolomic exploration of *Mycobacterium tuberculosis* stress response to cinnamaldehyde. *Biomolecules*, 10(3): 357 (ИФ₂₀₁₉ 4.082; Q2).

Abstract: The antimycobacterial activity of cinnamaldehyde has already been proven for laboratory strains and for clinical isolates. What is more, cinnamaldehyde was shown to threaten the mycobacterial plasma membrane integrity and to activate the stress response system. Following promising applications of metabolomics in drug discovery and development we aimed to explore the mycobacteria response to cinnamaldehyde within cinnamon essential oil treatment by untargeted liquid chromatography–mass spectrometry. The use of predictive metabolite pathway analysis and description of produced lipids enabled the evaluation of the stress symptoms shown by bacteria. This study suggests that bacteria exposed to cinnamaldehyde could reorganize their outer membrane as a physical barrier against stress factors. They probably lowered cell wall permeability and inner membrane fluidity, and possibly redirected carbon flow to store energy in triacylglycerols. Being a reactive compound, cinnamaldehyde may also contribute to disturbances in bacteria redox homeostasis and detoxification mechanisms.

Резюме: Антимикобактериалната активност на цинамалдехид е потвърдена при използването на лабораторни щамове (*M. tuberculosis* H37Ra) и клинични изолати. В допълнение на това, цинамалдехидът разрушава целостта на плазмената мембрана при микобактериите и активира системи свързани със стреса. Имайки предвид приложението на метаболомиката в откриването на лекарствени молекули, това изследване е проведено, за да се проучи отговорът на микобактериите към цинамалдехид (който е част от състава на етеричното масло в канелата) с провеждането на анализи чрез течна хроматография-маспектрометрия. Прилагането на методики за предвиждане на промени в метаболитните пътища и характеристика на продуцираните липиди, позволява оценката на стресовите симптоми при бактериите. Резултатите от това изследване предполагат, че микобактериите изложени на третиране с цинамалдехид могат да използват своята външна мембрана като физическа бариера спрямо различни стресови фактори. Най-вероятно микобактериите редуцират пропускливостта на клетъчната си стена, както и транспорта на флуиди през нея и така пренасочват потока на въглерода към натрупване на триацилглицероли и съхранение на енергия. Наред с това цинамалдехидът нарушава редокс хомеостазата на бактериите, както и техните механизми на детоксификация.

Yordanova Z.P., Rogova M.A., Zhiponova M.K., **Georgiev M.I.***, Kapchina-Toteva V.M. (2017) Comparative determination of the essential oil composition in Bulgarian endemic plant *Achillea thracica* Velen. during the process of *ex situ* conservation. *Phytochemistry Letters*, 20: 456-461 (ИФ₂₀₁₇ 1.575; Q2).

Abstract: *Ex situ* conservation of Bulgarian endemic plant *Achillea thracica* Velen. was achieved by successful *in vitro* cultivation of mono-nodal segments on MS-B5 medium supplemented with 1.0 mg/L BA for 20 days and subsequent transferring of regenerated plants on hormone free basal MS-B5 medium for root development and accumulation of leaf biomass. *In vitro* multiplied plants were successfully acclimated in a growth chamber with 100% survival. GC-MS analysis of the essential oils resulted in the identification of 30, 10 and 28 compounds in *in situ* grown, *in vitro* cultivated and *ex vitro* adapted plants, respectively, constituting 77.7%, 99.9% and 84.1% of the total oils. The wider variety of compounds was found in the essential oils of *in situ* and *ex vitro* adapted plants where santolina alcohol, b-eudesmol, 1,8-cineole, germacrene D, a-cadinol and artemisia alcohol were the principal components comprising 68.7% and 69.3 of the oil, respectively. *In vitro* cultivated plants consist of mainly 1,8-cineole, germacrene D and artemisia alcohol representing 87% of the oil. Different growth conditions affect the composition of essential oils, suggesting their possible involvement in the process of adaptation and surviving in changing environmental conditions.

Резюме: *Ex situ* консервацията на българското ендемично растение *Achillea thracica* Velen. е постигната чрез *in vitro* култивиране на моно-нодални сегменти върху MS-B5 хранителна среда с добавени 1.0 mg/L 6-бензиламинопуридин за 20 дни и следващ трансфер на регенерираните растения върху базова MS-B5 хранителна среда без добавени растежни регулатори. Тази хранителна среда се използва за развитие на корени и акумулиране на листна биомаса. *In vitro* размножените растения са успешно аклиматизирани в растежна камера със 100% преживяемост. Газхроматографски-маспектрални анализи на етеричното масло показват наличието на 30, 10 и 28 компонента в *in situ* растящите, *in vitro* култивираните и *ex vitro* адаптираните растения, съответно, които съставляват 77.7%, 99.9% и 84.1% от общия състав на етеричното масло. По-голямо вариране в състава на етеричното масло се наблюдава между *in situ* и

ex vitro адаптираните растения, където сантолиновия алкохол, β -еудесмол, 1,8-цинеол, гермакрен Д, α -кадинол и артемизинов алкохол са мажорните компоненти, съставляващи 68.7% и 69.3% от състава на етеричното масло, съответно. *In vitro* култивираните растения съдържат основно 1,8-цинеол, гермакрен Д и артемизинов алкохол, които представляват 87% от етеричното масло. Различните условия на растеж дават отражение върху състава на етеричните масла, което дава предпоставки за тяхното евентуално участие в процесите на адаптиране и преживяване в променящите се условия.

Alipieva K.*, Simova S., Zahmanov G., Zhou S., Wolfender J-L., **Georgiev M.I.*** (2017) New tetraacetylated iridoid glycosides from *Sambucus ebulus* L. leaves. *Phytochemistry Letters*, 20: 429-432 (**ИФ**₂₀₁₇ **1.575; Q2**).

Abstract: Two new minor “Valeriana type” iridoid glycosides (1) and (2) along with 3 known flavonol glycosides [quercetin-3-*O*- β -glucopyranosyl-7-*O*- α -rhamnopyranoside (3), quercetin-3-*O*- β -glucopyranoside (4) and isorhamnetin-3-*O*- β -glucopyranoside (5)] were isolated from *Sambucus ebulus* L. leaves. Their structures were unambiguously elucidated by means of 1D- and 2D-NMR, and UPLC-TOF MS. Compound 2 is a rare representative of iridoid diglycosides, containing uncommon ribohexo-3-ulopyranosyl sugar moiety.

Резюме: Изолирани са два нови “валерианов тип” иридоидни гликозида и три познати флавонол гликозиди (кверцетин-3-*O*- β -глюкопиранозил-7-*O*- α -рамно-пиранозид, кверцетин-3-*O*- β -глюкопиранозид и изорамнетин-3-*O*- β -глюкопиранозид) от листата на *Sambucus ebulus* L. Техните структури са доказани чрез 1Д- и 2Д-ЯМР и ултра висококоелефективна течна хроматография комбинирана с маспектрометрия (UPLC-ToF-MS). Едната от двете изолирани нови молекули е рядко срещан представител на иридоидните гликозиди, които имат в състава си рибохексозо-3-улопиранозилов захарен остатък.

Marchev A.S.*, Aneva I.Y., Koycheva I.K., **Georgiev M.I.*** (2017) Phytochemical variations of *Rhodiola rosea* L. wild-grown in Bulgaria. *Phytochemistry Letters*, 20: 386-390 (**ИФ**₂₀₁₇ **1.575; Q2**).

Abstract: *Rhodiola rosea* L. is a plant species with highly recognized adaptogenic properties and hence with an intensive application in traditional medicine, as well as, in clinical practice. The plant is characterized by a high phytochemical variability, depending on the geographical location among others. In this study, we report on the application of NMR-based metabolomics (1D and 2D) combined with multivariate data analysis and an HPLC method development for quantitative determination of the metabolic differences in *R. rosea* rhizomes, roots and aerial parts from its natural habitat in Bulgaria. In the rhizomes the content of salidroside, rosarin, rosavin and rosin was 2.67%, 0.37%, 1.97% and 0.04%, respectively, while their respective amounts in the roots were 0.31%, 0.06%, 0.39% and 0.01%.

Резюме: *Rhodiola rosea* L. е растителен вид със силно изразено адаптогенно действие, интензивно прилаган в традиционната медицина и клиничната практика. Растението се характеризира с висока фитохимична вариабилност, която зависи най-вече от географската локация. В това изследване е използвана 1Д- и 2Д-ЯМР-базираната метаболомика, комбинирана с мултивариативен анализ на данните, както и ВЕТХ за количествено определяне на метаболитните вариации в коренища, корени и надземни

части на *R. rosea* от нейни естествени местообитания в България. В коренищата съдържанието на салидрозид, розарин, розавин и розин е 2.67%, 0.37%, 1.97% и 0.04%, съответно, докато техните количества в корените са 0.31%, 0.06%, 0.39% и 0.01%.

Koziol E., Erdogan Orhan I., Senol F.S., Alipieva K., **Georgiev M.I.**, Skalicka-Wozniak K.* (2016) Development of an efficient protocol for cimifugin isolation from *Peucedanum schottii* and evaluation of its enzyme inhibitory activity. *Natural Product Communications*, 11(8): 1107-1110 (**ИФ**₂₀₁₆ **0.773; Q4**).

Abstract: The dichloromethane (DCM) extract of the fruits of *Peucedanum schottii* Besser ex DC. (Apiaceae) was subjected to high-performance counter-current chromatography (HPCCC) for the efficient and fast separation (30 min) and isolation of cimifugin using an ethyl acetate: water (1:1 v/v, $K = 1.01$) system. The analytical scale-optimized separation was easily scaled to semi-preparative conditions. Cimifugin (11.25% yield, 96.5% purity) was isolated for the first time from *P. schottii* and characterized by NMR spectroscopy. Cimifugin and the crude DCM extract were evaluated using ELISA microtiter assays for their inhibitory potential against the cholinesterases (acetylcholinesterase - AChE and butyrylcholinesterase - BChE), and tyrosinase (TYR), which are key enzymes for the treatment of some neurodegenerative diseases, *i.e.* Alzheimer's and Parkinson's. The crude extract exhibited a weak inhibitory activity against AChE, BChE, and TYR (4.2, 35.5, and 0% at 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 10.3, 40.0, and 12.2% at 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively), while cimifugin displayed low to moderate inhibition towards AChE and BChE (3.1 and 21.6%, respectively) at 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Резюме: Дихлорметановият екстракт от плодовете на *Peucedanum schottii* Besser ex DC. (сем. Апиасеае) е подложен на високо ефективна противотокова хроматография (HPCCC) целяща бързо разделяне (в рамките на 30 min) и изолиране на цимифугин чрез използването на елуентна ситема етилацетат: вода (1:1 v/v, $K = 1.01$). В следствие методът е оптимизиран до полупрепаративни условия. Цимифугин (11.25% добив и 96.5% чистота) е изолиран за пръв път от *P. schottii* и структурно доказан чрез ЯМР спектроскопия. Цимифугин и дихлорметановия екстракт са анализирани чрез ELISA за изследване на техния инхибиращ потенциал спрямо холинестеразите (ацетил- и бутирилхолинестераза) и тирозиназа, които са ключови ензими при третирането на някои невродегенеративни заболявания, като болестите на Алцхаймер и Паркинсон. Екстрактът показва слаба инхибираща активност спрямо ацетилхолинестераза, бутирилхолинестераза и тирозиназа (4.2, 35.5 и 0% при концентрация 100 $\mu\text{g/mL}$ и 10.3, 40.0 и 12.2% при 200 $\mu\text{g/mL}$, съответно), докато цимифугин е с ниска до средна инхибираща активност спрямо ацетилхолинестераза и бутирилхолинестераза (3.1 и 21.6%, съответно) при 200 $\mu\text{g/mL}$.

Zahmanov G., Alipieva K., Simova S., **Georgiev M.I.*** (2015) Metabolic differentiations of dwarf elder by NMR-based metabolomics. *Phytochemistry Letters*, 11: 404-409 (**ИФ**₂₀₁₅ **1.353; Q2**).

Abstract: *Sambucus* plants have prominent place in folk medicine of the people from Europe and the Middle East. *Sambucus ebulus* (both above and under ground parts) preparations showed anti-neoplastic, antimicrobial (incl. antiviral) and anti-inflammatory properties. Elderberries accumulate sugars and fibers, vitamins and minerals, besides abundant secondary metabolites, as flavonoids, anthocyanins, phytosterols, triterpenes and iridoid glycosides, among others. *Sambucus* plants, however, also accumulate cyanogenic glycosides, whose

presence is undesirable. Despite many applications so far the knowledge of the metabolites, accumulated in *Sambucus* species, is still limited and based mainly on determination of the major compounds. Here we report the application of ^1H NMR metabolic fingerprinting in combination with principal component and hierarchical clustering analyses to reveal the metabolic differences of *Sambucus* mature and immature fruits, and plant leaves. Moreover, we show that immature fruits and leaves of *S. ebulus* have similar metabolome, which apparently undergoes significant changes during the fruit ripening stage. Sambunigrin was not detectable in any sample. To the best of our knowledge this is the first report on the systematic analysis of *S. ebulus* metabolome.

Резюме: Растенията от род *Sambucus* имат важно място в традиционната медицина на страните в Европа и Средния Изток. Препарати от *Sambucus ebulus* (въздушни и подземни части) притежават антинеопластична, антимикробна (вкл. антивирусна) и противовъзпалителна активност. Тревистият бъз акумулира захари, фибри, витамини и минерали, заедно с характерните за него вторични метаболити, като флавоноиди, антоциани, фитостероли, тритерпени и иридоидни гликозиди. Растенията от род *Sambucus* обаче, акумулират цианогенни гликозиди, чието присъствие е нежелано. Въпреки тяхното широко приложение, наличното знание за метаболитния състав във видовете от род *Sambucus* е все още ограничено само до определяне на главните метаболити. В това изследване е приложена ЯМР-базираната метаболомика заедно с принципен компонентен и йерархичен клъстерен анализ за изследване на метаболитните разлики в листа, зрели и незрели плодове от *Sambucus*. Наред с това, е доказано, че незрелите плодове и листа от *S. ebulus* имат в състава си сходни метаболити, които очевидно претърпяват значителни промени по време на зреенето. Това е първият доклад, базиран на систематичния анализ на метаболити от *S. ebulus*.

Zahmanov G., Alipieva K., Denev P., Todorov D., Hinkov A., Shishkov S., Simova S., **Georgiev M.I.*** (2015) Flavonoid glycosides profiling in dwarf elder fruits (*Sambucus ebulus* L.) and evaluation of their antioxidant and anti-herpes simplex activities. *Industrial Crops and Products*, 63: 58-64 (ИФ₂₀₁₅ 3.449; Q1).

Abstract: Dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.) is a popular medicinal plant, used for centuries in the folk medicine of the Balkan Peninsula. *S. ebulus* preparations have shown anti-inflammatory, anti-neoplastic and antimicrobial properties, besides abundant wound healing, antioxidant and anti-ulcerogenic activities. We developed a scheme for isolation of individual compounds utilizing different chromatographic techniques, while the structure elucidation was performed by means of 1D and 2D NMR. Five flavonoid glycosides, e.g. quercetin-3-*O*-laminaribioside [1], isorhamnetin-3-*O*-laminaribioside [2], quercetin-3-*O*-rutinoside [3], isorhamnetin-3-*O*-rutinoside [4], isorhamnetin-3-*O*-glucoside [5], were identified accordingly. Compounds 1 and 2 are reported for the first time in the genus *Sambucus*. Several triterpenes – ursolic, oleanolic and maslinic acid – were tentatively identified by GC-MS. The evaluation of anti-herpes simplex virus type 1 and antioxidant (in ORAC_{FL} and HORAC_{FL}) properties suggests that the dwarf elder fruits might serve as a powerful source of valuable molecules for various purposes.

Резюме: Тревистият бъз (*Sambucus ebulus* L.) е медицинско растение, използвано от векове във фолклорната медицина на страните от Балканския полуостров. Препарати от *S. ebulus* притежават противовъзпалителна, антинеопластична и антимикробна активност, наред с характерните за тях антиоксидантна, противоязвена активност и свойството им да заздравяват външни рани. Разработена е схема за изолиране и

пречистване на индивидуални молекули чрез използването на различни хроматографски техники, а доказването на структурите им е извършено чрез 1Д- и 2Д ЯМР-базирана метаболомика. Идентифицирани са пет флавоноидни гликозиди, като кверцетин-3-*O*-ламинарибиозид [1], изорамнетин-3-*O*-ламинарибиозид [2], кверцетин-3-*O*-рутинозид [3], изорамнетин-3-*O*-рутинозид [4] и изорамнетин-3-*O*-глюкозид [5], съответно. Съединения 1 и 2 са докладвани за пръв път в рода *Sambucus*. Няколко тритерпенови съединения, като урсолова, олеанолова и маслиненна киселина са идентифицирани чрез газхроматография-маспектрометрия. Фракцията богата на флавоноиди показва потенциална антиоксидантна активност, докато грубия метанолен екстракт показва анти-вирусна активност срещу херпес симплекс вирус тип 1 (HSV-1), което предполага, че плодовете на бъзака могат да бъдат използвани като източник на ценни вторични метаболити с важни фармакологични активности.

Georgiev M.I.*, Ali K., Alipieva K., Verpoorte R., Choi Y.H. (2011) Metabolic differentiations and classification of *Verbascum* species by NMR-based metabolomics. *Phytochemistry*, 72: 2045-2051 (ИФ₂₀₁₁ 3.351; Q1).

Abstract: The genus *Verbascum* L. (mulleins) comprises of about 360 species of flowering plants in the Scrophulariaceae family. Mulleins have been used in the traditional folk medicine for centuries, for treatment of a wide range of human ailments, inter alia bronchitis, tuberculosis, asthma, and different inflammations. Despite all applications the knowledge of the metabolites, accumulated in different mullein species, is still limited and based mainly on determination of the major compounds. Here we report the application of ¹H NMR metabolic fingerprinting in combination with principal component analyses (PCA) in five different *Verbascum* species. Based on the obtained results mulleins were divided in two groups: group A (*Verbascum phlomoides* and *Verbascum densiflorum*) and group B (*Verbascum xanthophoeniceum*, *Verbascum nigrum* and *Verbascum phoeniceum*). Further it was found that the plants in group B accumulate higher amounts of bioactive iridoid and phenylethanoid glycosides. *V. xanthophoeniceum* and *V. nigrum* accumulate higher amounts of the pharmaceutically-important harpagoside (~0.5% on dry weight basis) and verbascoside, forsythoside B and leucosceptoside B (in total 5.6–5.8% on dry weight basis), which underlines the possibility for their application in pharmaceutical industry. To the best of our knowledge this is the first report on the analyses of *Verbascum* sp. leaf metabolome.

Резюме: Родът *Verbascum* L. (лопен) включва около 360 вида, принадлежащи към семейство Scrophulariaceae (Живеничеви). Лопените са използвани в традиционната медицина от векове при третирането на множество заболявания при хората, като бронхит, туберкулоза, астма и редица други възпаления. Въпреки всички тези приложения, познанията за акумулираните вторични метаболити в различни видове лопени е все още ограничено и се свежда само до определяне на мажорните компоненти в тях. Използвана е ЯМР-базираната метаболомика в комбинация с принципен компонентен и йерархичен клъстерен анализ за изследване на метаболитните различия при пет различни вида *Verbascum*. На база на получените резултати изследваните лопени са класифицирани в две групи: група А (*V. phlomoides* и *V. densiflorum*) и група Б (*V. xanthophoeniceum*, *V. nigrum* и *V. phoeniceum*). Също така е установено, че растенията от група Б акумулират по-високи количества от биоактивни иридоиди и фенилетаноидни гликозиди. *V. xanthophoeniceum* и *V. nigrum* акумулират високи количества от харпагодзид (~0.5% от сухото тегло), а също така вербаскозид, форситозид Б и левкосептозид Б (общо 5.6–5.8% от сухото тегло), което подчертава възможността за тяхното приложение във фармацевтичната индустрия, което разбира

се най-напред трябва да се потвърди експериментално. Това е първото съобщение за анализ на метаболитния състав в листа на видове *Verbascum*.

По фармакология и оценка на биологична активност

Hinkov A.*, Angelova P., Marchev A., Hodzhev Y., Tsvetkov V., Dragolova D., Todorov D., Shishkova K., Kapchina-Toteva V., Blundell R., Shishkov S., **Georgiev M.I.** (2020) *Nepeta nuda* ssp. *nuda* L. water extract: Inhibition of replication of some strains of human alpha herpes virus (genus Simplex virus) *in vitro*, mode of action and NMR-based metabolomics. *Journal of Herbal Medicine*, 21: 100334 (ИФ₂₀₁₉ 2.221; Q2).

Abstract: *Nepeta nuda* L. has been used in traditional folk medicine for its diuretic, anti-asthmatic, antioxidant, spasmolytic, sedative and analgesic properties (attributed to the nepetalactones). In the present study, water extract from *Nepeta nuda* ssp. *nuda* L. was tested in order to study its' effect on the replication of Human Alpha herpes virus (HHV) type 1, strain F (ACV-sensitive) and type 2, strain DD (ACV-resistant) *in vitro*. Toxicity was measured at 48 h ($CC_{50} = 7.35 \text{ mg/ml} \pm 0.06$) and 72 h ($CC_{50} = 4.488 \text{ mg/ml} \pm 0.308$) after infection. The extract showed potent anti-herpesvirus activity in both antiviral tests performed (MTT-based colorimetric assay and yield reduction assay). By the time the extract was added, two experimental arrangements were applied. The antiviral activity increased when water extract was added simultaneously with the inoculation of the cell monolayer (EC_{50} of $0.66 \text{ mg/ml} \pm 0.04$ and $0.788 \text{ mg/ml} \pm 0.009$ for the F and the DD strains, respectively, measured via colorimetric assay). The IC_{50} value was $0.181 \text{ mg/ml} \pm 0.073$ and $0.0888 \text{ mg/ml} \pm 0.014$ for the F and the DD strains, respectively, measured via yield reduction assay. Unfortunately, selectivity for viral versus cellular molecular targets (SI) was low except for the SI values (40.60 and 82.77 for the F and the DD strains, respectively) obtained via the yield reduction assay when water extract was added simultaneously with the inoculation of the cell monolayer. In both types of antiviral assays water extract retained activity against the ACV-resistant DD strain. The virucidal assay showed that water extract did not reduce the infectivity of either of the strains used at a concentration equal to the maximum non-toxic concentration. Therefore, the above-mentioned rise in the antiviral activity detected in experimental settings when the extract was added immediately after inoculation is not due to direct inactivation of the extracellular virions. Rather, it is due to interference with the adsorption but not the penetration (according to the results of the conducted experiment). The time of addition test demonstrated that the water extract continued to exhibit antiviral activity even when added 10 h after infection. All these observations suggest that water extract exhibits its anti-herpesvirus activity by influencing both early (adsorption) and late events of HHV replication. Metabolomic studies of the extract showed that the major phenolic acids present in the extract include rosmarinic, chlorogenic, gallic, vanillic, caffeic, protocatechuic, ferulic and cinnamic acids; while the presence of flavonoids was marked by cirsimaritin, chrysoeriol, vanillin, rutin and quercetin.

Резюме: *Nepeta nuda* L. се употребява в традиционната медицина поради нейните диуретични, анти-асматични, антиоксидантни, спазмолитични, седативни и аналгетични свойства (дължащи се на съдържащите се в растението непеталактони). В настоящето изследване е проучен ефекта на воден екстракт от *Nepeta nuda* ssp. *nuda* L. върху репликацията на херпесни вируси - Human Alpha Herpes (HHV) вирус тип 1, щам F (ACV-чувствителен) и HHV тип 2, щам DD (ACV-резистентен) *in vitro*. Екстрактът показва изразена анти-херпесна активност при двата използвани теста (MTT-базиран колориметричен анализ и при тест за намаляване на добива). Противовирусната

активност се повишава, когато екстрактът се прилага едновременно с инокулацията на моделните клетки с вирусните щамове (EC_{50} 0.66 mg/mL \pm 0.04 и 0.788 mg/mL \pm 0.009 за щам F и DD съответно). Стойностите на IC_{50} са 0.181 mg/mL \pm 0.073 и 0.0888 mg/mL \pm 0.014 за F и DD респективно, отчетени при теста за намаляване на добива. При двете опитни постановки водният екстракт запазва противовирусната си активност срещу ACV-устойчивият DD щам. Анализът за вируцидна активност показва, че водният екстракт прилаган в максималната нетоксична концентрация не намалява инфекциозността на нито един от двата изследвани щама. Следователно, споменатото повишаване в противовирусното действие на екстракта при прилагане непосредствено след инокулацията не се дължи на инактивиране на вътреклетъчните вирионни частици. Вероятно това е по-скоро свързано с промяна в абсорбцията, отколкото с проникването на вируса в клетката (съгласно проведените експерименти). Тестове за времето на прилагане на екстракта показват, че противовирусният ефект на водния екстракт продължава дори и при прилагане на 10-я час след инокулацията. Всички тези наблюдения предполагат, че водният екстракт от *N. nuda* повлиява както ранните фази (абсорбцията) така и късните прояви (репликацията) на HHV инфекцията. Метаболомният анализ на екстракта показва като основни молекули розмаринова, хлорогенова, галова, ванилена, кафеена, протокатехуена, ферулова и цинамова киселини; докато флавоноидите са представени предимно от цирсимаритин, хризеоиол, ванилин, рутин и кверцетин.

Hu T., Linghu K., Huang S.*, Battino M., Georgiev M.I., Zengin G., Li D., Deng Y., Wang YT., Cao H.* (2019) Flaxseed extract induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 127: 188-196 (ИФ₂₀₁₉ 4.679; Q1).

Abstract: Significant evidence indicated that flaxseed (*Linum usitatissimum*) possesses various positive health aspects such as reducing the risk of cancer and cardiovascular diseases. The fatty acids are considered to be responsible for these benefits of flaxseed. Herein, the *in vitro* effects of flaxseed extract on the growth and apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells were investigated. The MCF-7 cells treated with flaxseed extract showed a dose-dependent decrease in cell viability. The flaxseed extract induced reactive oxygen species and the flow cytometric analysis demonstrated that flaxseed fatty acids triggered apoptosis of MCF-7 cells, which was also shown by the loss of mitochondrial membrane potential and caspase cascade reaction. Thus, the flaxseed extract regulated the growth of MCF-7 cells and induced apoptosis. Eventually, the flaxseed could be used as a dietary supplement to prevent breast cancer.

Резюме: Редица доказателства сочат ползите от лененото семе (*Linum usitatissimum*) за здравето, сред които са намаляване на риска от ракови и кардиоваскуларни заболявания. Масните киселини са смятани като отговорни за позитивния ефект на семената от лен. Проучен е ефекта на екстракт от ленено семе върху растежа и апоптозата на човешки клетки от карцином на млечна жлеза (клетъчна линия MCF-7). Третираните с екстракт от ленено семе MCF-7 клетки показват дозо-зависимо намаляване на клетъчната си жизненост. Екстрактът индуцира образуването на реактивни кислородни форми, а анализът с проточна цитометрия показва индуциране на апоптоза в MCF-7 клетъчната линия. Тези данни бяха потвърдени и от загубата на митохондриален потенциал и активиране на каспазните каскадни процеси в клетките. Регулирането на клетъчния растеж и индуцирането на апоптоза при MCF-7 клетъчна линия е основание лененото семе да намери приложение като хранителна добавка за превенция на рак на млечната жлеза.

Jiang X., Cao C., Sun W., Chen Z., Li X., Nahar L., Sarker S.D., **Georgiev M.I.**, Bai W.* (2019) Scandanolone from *Cudrania tricuspidata* fruit extract suppresses the viability of breast cancer cells (MCF-7) *in vitro* and *in vivo*. *Food and Chemical Toxicology*, 126: 56-66 (**ИФ**₂₀₁₉ **4.679**; **Q1**).

Abstract: Scandanolone, an isoflavone, has shown anti-cancer potential. In this study, we extracted scandanolone from *Cudrania tricuspidata* fruit and evaluated its anti-breast cancer effects as well as toxicity in cell and animal models. In cell model, scandanolone suppressed the breast cancer MCF-7 cells viability, ceased mitotic cell cycle, decreased mitochondrial membrane potential, up-regulated cleaved caspase-3 and promoted the phosphorylation of p53. Additionally, this isoflavone promoted cell apoptosis and induced a sustained activation of the phosphorylation of p38 and ERK, but not JNK and Akt. The effects were further verified in a human MCF-7 breast cancer xenograft model, where scandanolone efficiently suppressed the cancer growth and increased apoptotic cells in tumor tissue. However scandanolone has also shown certain toxicity to normal hepatocytes and breast epithelial cells. It could be concluded that scandanolone suppressed the growth of breast cancer cells, but its toxicity towards normal cells might limit its potential clinical use.

Резюме: Сканденолон е изофлавоон извлечен от плодовете на *Cudrania tricuspidata*. В това изследване сканденолон е приложен на MCF-7 туморна клетъчна линия и миши модел на рак на млечната жлеза с цел да се оцени противотуморния му потенциал. При *in vitro* експериментите сканденолон потиска клетъчната жизнестойност, нарушава митотичната фаза на клетъчния цикъл, намалява митохондриалния потенциал, повишава активността на каспаза 3 и провокира фосфолирирането на про-апоптотичния протеин p53. В допълнение на това, изофлавоонът предизвиква апоптоза и активиране на p38 и ERK, но не и на JNK и Akt. Тези ефекти са потвърдени и при миши модел с ксенотрансплантиране на MCF-7 ракови клетки, при който сканденолон ефикасно потиска растежа на тумора и повиши броя апоптотични клетки в раковата тъкан. Въпреки това, сканденолон показва определена токсичност и към хепатоцити и здрави клетки от млечна жлеза. Поради това, са необходими допълнителни изследвания по отношение на елиминирането му от организма преди да се пристъпи към разработването на похвати за клинична употреба на сканденолон.

Amirova K.M., Dimitrova P., Marchev A.S., Aneva I.Y., **Georgiev M.I.*** (2019) *Clinopodium vulgare* L. (wild basil) extract and its active constituents modulate cyclooxygenase-2 expression in neutrophils. *Food and Chemical Toxicology*, 124: 1-9 (**ИФ**₂₀₁₉ **4.679**; **Q1**).

Abstract: *Clinopodium vulgare* L. (wild basil) has a wide range of ethnopharmacological applications and accumulates a broad spectrum of phenolic compounds, recognized for their anti-inflammatory and anticancer properties. The triggered cyclooxygenase-2 (COX-2) expression is creating an immunosuppressive microenvironment in the inflamed tissue and considered to be the main cause of failure of even new anticancer-/immune-therapies. Nowadays, selective and novel plant-derived COX-2 inhibitors with safe profile are subject of profound research interest.

This study aimed to analyze the metabolic profile of *C. vulgare* and search for phenolic molecules with potential biological properties. By application of ¹H and 2D-NMR (Nuclear Magnetic Resonance) profiling, caffeic, chlorogenic acids and catechin were identified along with a bunch of primary and secondary metabolites. Further, the biological effect of *C. vulgare* extract (CVE) and its constituents on zymosan-induced COX-2 expression and

apoptosis of murine neutrophils have been studied. The CVE, caffeic and chlorogenic acids inhibited zymosan-induced COX-2 expression in bone marrow neutrophils, *in vitro* and *in vivo* activated. The obtained data indicate that CVE may have a good potential to manipulate neutrophil functions, however, its action may depend on the cellular state, the inflammatory milieu and the relative content of caffeic and chlorogenic acid in the extract.

Резюме: *Clinopodium vulgare* L. (котешка стъпка) е медицинско растение с редица етнофармакологични приложения, продуциращо широк спектър от фенолни съединения, известни с техните противовъзпалителни и противотуморни свойства. Активираната експресия на циклооксигеназа 2 (COX-2) създава имunosупресивна среда във възпалената тъкан и е считана за основна причина за неуспеха в противотуморната и имунната терапия. В наши дни, селективни нови COX-2 инхибитори от растителен произход с добър профил на безопасност са обект на изключителен научен интерес. В това изследване е анализиран метаболитния профил на *C. vulgare* и са идентифицирани фенолните молекули с потенциална биологична активност. Чрез прилагане на 1Д- и 2Д-ЯМР профилиране са идентифицирани кафеена и хлорогенова киселини, катехин и други първични и вторични метаболити. Допълнително, биологичният ефект на екстракт от *C. vulgare* (CVE) и неговите активни компоненти е проучен при зимозан-индуцирана COX-2 експресия и апоптоза на миши неутрофили. CVE, кафеената и хлорогенова киселини потискат COX-2 експресията, индуцирана от зимозан в неутрофили изолирани от костен мозък активирани, както *in vitro* така и *in vivo*. Кафееният остатък присъства в структурата и на двете фенолни киселини вероятно е отговорен за противовъзпалителната им активност. От друга страна катехина допълнително стимулира експресията на COX-2 и при двата модела. Получените данни показват, че CVE има изявен потенциал да модулира неутрофилната функция, въпреки че, неговото действие е зависимо от клетъчното състояние, възпалителната среда и относителното съдържание на кафеена и хлорогенова киселини в екстракта.

Dimitrova P., Alipieva K., Stojanov K., Milanova V., **Georgiev M.I.*** (2019) Plant-derived verbascoside and isoverbascoside regulate Toll-like receptor 2 and 4-driven neutrophils priming and activation. *Phytomedicine*, 55: 105-118 (**ИФ₂₀₁₉ 4.268; Q1**).

Abstract: *Background:* Neutrophils have a short live in circulation and accelerate greatly local immune responses via increased granulopoiesis and migration at high numbers to infected or inflamed tissue.

Hypothesis: Since neutrophils produce a variety of factors with destructive and pro-inflammatory potential the regulation of their homeostasis and functions might be eventually beneficial in inflammation-related pathological conditions. Herein we investigated the effect of natural-derived verbascoside (Verb) and its positional isomer isoverbascoside (IsoVerb) on neutrophil functions.

Methods: We used purified murine bone marrow (BM) neutrophils to study cell responsiveness to priming or activation via Toll-like receptors (TLRs) 2 and 4. The expression of CD11b, chemokine (CXC motif) receptor 2 (CXCR2), the intracellular level of phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and tumor necrosis factor (TNF)- α in neutrophils were determined by flow cytometry while the release of macrophage inflammatory protein (MIP)-2 in culture supernatant was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results: We found that Verb appeared less powerful inhibitor of TLR2 and TLR4-mediated apoptosis than IsoVerb. However at concentrations below 16 μ M and in LPS priming conditions Verb was more selective inhibitor of CD11b and CXCR2 expression than

IsoVerb. Both compounds showed similar activity on integrin/ chemokine receptor expression when neutrophils were stimulated with ZY or were activated with LPS. Verb sustained CXCR2 expression and turnover via regulation of the cell responsiveness to its ligand KC (CXCL1) and via the release of MIP-2 (CXCL2). Both Verb and IsoVerb increased TNF- α production and inhibited p38 phosphorylation in TNF- α ⁺ cells. We fail to discriminate sharply between Verb's and IsoVerb's efficacy when studying p38 phosphorylation in LPS stimulated neutrophils. The multi-parametric analysis provides critical insight on the range of on-target effects of Verb and IsoVerb.

Conclusion: The strength and selectivity of Verb and IsoVerb depended on the degree of activation and functional state of neutrophils, and both compounds are with potential to affect neutrophil-related pathologies/conditions in heterogenic populations.

Резюме: Неутрофилните клетки продуцират редица имунни фактори с деструктивни и про-възпалителни функции, поради което регулирането на техните функции може да повлияе положително на редица патологични състояния. Изследвано е влиянието на природната молекула вербаскозид и позиционния му изомер изовербаскозид върху неутрофилната функция. Молекулярно-биологичният анализ показва, че вербаскозид е по-слабо potentен инхибитор на Toll-like рецептори (TLRs) 2 и 4 от изовербаскозид. Въпреки това, в концентрации под 16 μ M и допълнително стимулиране с липополизахарид, вербаскозид се оказва с по-високо селективна инхибиторна активност към CD11b и CXCR2 експресията при неутрофили от изовербаскозид. Двете молекули показват сходна активност към интегрин/хемокиновия рецептор при възпаление на неутрофили индуцирано от зимозан или липополизахарид. Вербаскозид поддържа експресията на CXCR2 посредством регулация в отговора на клетките към неговия лиганд KC (CXCL1) и освобождаването на MIP-2 (CXCL2). Както вербаскозид, така и, изовербаскозид повишават продукцията на TNF- α и инхибират фосфорилирането на p38 при TNF- α ⁺ клетки. Двете молекули показват значителен потенциал за повлияване на живото-застрашаващи патологии, свързани с повишена неутрофилна активност като сепсис или стерилно системно възпаление.

Vasileva L.V.*, Saracheva K.E., Ivanovska M.V., Petrova A.P., Marchev A.S., **Georgiev M.I.**, Murdjeva M.A., Getova D.P. (2018) Antidepressant-like effect of salidroside and curcumin on the immunoreactivity of rats subjected to a chronic mild stress model. *Food and Chemical Toxicology*, 121: 604-611 (**ИФ**₂₀₁₈ **3.775; Q1**).

Abstract: Deregulated cytokines' production is found in depressed patients. Salidroside and curcumin both have been described with potential antidepressant-like activities. The present study investigated the effect of pure salidroside, curcumin and their combination on the immunoreactivity of animals, subjected to a chronic mild stress (CMS) model, followed by lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation. Wistar male rats were separated in the following six groups: control, CMS model, fluoxetine (2.5 mg/kg, oral), salidroside (5 mg/kg, oral), curcumin (20 mg/kg, oral) and salidroside + curcumin (5 mg/kg + 20 mg/kg, oral). Changes in glucose preference, spatial learning and exploratory behavior were recorded. The IL-6 levels in the rats' sera and of the TNF- α levels in the rats' sera and the brain tissue homogenate were evaluated. The groups exposed to stress and treated with fluoxetine, salidroside, curcumin or salidroside + curcumin showed increase in the glucose preference and locomotor activity, as well as, decrease in the escape latency and the cytokines' levels compared to the CMS model group. The chronic stress induced behavioral alternations and increased cytokines' levels in rats which were reversed by administration of salidroside and

curcumin, suggesting antidepressant-like effects comparable to that of fluoxetine and potential synergistic interaction regarding the anti-inflammatory and anti-stress effects.

Резюме: При пациенти с депресия често се установява дисрегулация в серумните нива на определени цитокини. Салидрозид и куркумин са природни молекули с известна антистресова активност. Изследван е ефектът на салидрозид и куркумин приложени самостоятелно, както и в комбинация върху имунната реактивност на плъхове, подложени на модел на хроничен стрес за 4 седмици последван от предизвикване на системно възпаление с липополизахарид. Флуоксетин е използван като позитивна контрола за анти-депресивно действие. Животните, подложени на процедура за хроничен непредвидим стрес демонстрират редица промени в поведенческите си реакции като анхедония, намален интерес към прием на глюкоза, нарушено покачване на телесно тегло и двигателна активност в сравнение с нестресираните контролни животни. Приложението на салидрозид и куркумин, както самостоятелно така и в комбинация предизвика анти-депресивен ефект изразен в намаляване на негативните прояви от приложението на хроничен стрес до нива сравними с тези на позитивната контрола флуоксетин. Като допълнение, анализът с ELISA на серум и мозъчен хомогенат на животните с модел на депресия показват понижаване в нивата на TNF- α и IL-6 при приложението на салидрозид, куркумин и комбинацията от двете молекули. Резултатите показват изразен имуномодулаторен, противовъзпалителен и анти-депресивен ефект на салидрозид и куркумин. Комбинацията им е с обещаващ терапевтичен потенциал за лечение на състояния на хроничен стрес и лека до умерена депресия.

Uysal S., Aktumsek A., Picot-Allain C.M.N., Unuvar H., Mollica M., **Georgiev M.I.**, Zengin G.*, Mahomoodally M.F. (2018) Biological, chemical and *in silico* fingerprints of *Dianthus calocephalus* Boiss.: A novel source for rutin. *Food and Chemical Toxicology*, 113: 179-186 (**ИФ**₂₀₁₈ **3.775**; **Q1**).

Abstract: Extracts (methanol, ethyl acetate, and water) from *Dianthus calocephalus* Boiss. prepared by different extraction techniques (maceration, Soxhlet, and ultrasonication) were studied for possible inhibitory action against key enzymes (α -amylase, α -glucosidase, acetyl cholinesterase, butyryl cholinesterase, and tyrosinase). Antioxidant potential was established using a battery of assays and phenolic compounds profiled by RP-HPLC. Binding pose of tyrosinase with rutin was studied by means of molecular docking. Methanol extracts showed the highest phenolic (39.35-40.25 mgGAE/g) content and rich in rutin (61.38-72.07 mg/g extract). Ethyl acetate extracts of *D. calocephalus* were potent inhibitors of acetyl (1.45-1.48 mgGALAE/g) and butyryl (2.44-2.74 mgGALAE/g) cholinesterases. Docking studies showed that rutin interacts with the side chains of the key amino acid residues and to the copper atom found at the active site of tyrosinase. Methanol extracts showed highest antioxidant capacity. *D. calocephalus* showed interesting biological properties that could be further studied to manage dia- betes, neurodegenerative diseases, Alzheimer's disease, and hyperpigmentation.

Резюме: Екстракти (метанолен, етилацетатен и воден) от *Dianthus calocephalus* Boiss., получени чрез различни техники на екстрахиране (мацерация, Соклет-екстракция и третиране с ултразвук) са изследвани за тяхната инхибиторна активност спрямо ключови ензими (α -амилаза, α -глюкозидаза, ацетил-, бутирилхолинестераза и тирозиназа). Антиоксидантният потенциал е установен чрез поредица от методи за определяне на антиоксидантна активност, а фенолното съдържание в екстракта бе определено чрез обратнофазова ВЕТХ. Свързващият афинитет на рутин към тирозиназа

е проучен чрез подход на молекулно моделиране. Метанолният екстракт показва най-високо съдържание на общи феноли 39.35-40.25 mg GAE/g, от който рутина е 61.38-72.07 mg/g екстракт. Етилацетатният екстракт от *D. calocephalus* значимо инхибира ацетил- (1.45-1.48 mgGALAE/g) и битурил- (2.44-2.74 mgGALAE/g) холинестеразите. Молекулното моделиране показва, че рутин взаимодейства със страничните вериги на ключови аминокислотни остатъци и с медния атом от активния център на тирозиназата.

Fierascu R.C., Georgiev M.I., Fierascu I.*, Ungureanu C., Avramescu S.A., Ortan A., Georgescu M.I., Sutan A.N., Zanfirescu A., Dinu-Pirvu C.E., Velescu B.S., Anuta V. (2018) Mitodepressive, antioxidant, antifungal and anti-inflammatory effects of wild-growing Romanian native *Arctium lappa* L. (Asteraceae) and *Veronica persica* Poiret (Plantaginaceae). *Food and Chemical Toxicology*, 111: 44-52 (ИФ₂₀₁₈ 3.775; Q1).

Abstract: The present study aims to evaluate the potential uses of hydroalcoholic extracts obtained from Romanian native wild-growing plants. The hydroalcoholic extracts were obtained from the burdock roots and respectively the aerial parts of birdseye speedwell. The extracts were characterised by HPLC (quantifying 13 compounds in the *V. persica* extract, 6 compounds in the *A. lappa* extract and confirming the presence of arctiin and arctigenin in the burdock extract). The antioxidant potential of the crude extracts was evaluated using two methods: the DPPH assay (79.91% for speedwell extract, 76.23% for burdock extract) and the phosphomolybdate method (296.5 mg/g ascorbic acid equivalents for burdock, 324.4 mg/g for speedwell). The crude extracts were found to be active against both fungal lines used (*Aspergillus niger* and *Penicillium hirsutum*), inhibition zones - 17.1 mm and 13.1 mm against *P. hirsutum*, respectively ca. 22 mm for both extracts against *A. niger*. The cytogenetic effects (assessed using the *Allium cepa* assay) revealed a series of chromosomal aberrations and nuclear aberrations induced in the meristematic root cells. The anti-inflammatory effect, estimated in two inflammation experimental models, showed a significant effect, especially for the speedwell extract. The results recommend the evaluated extracts as promising sources of biologically-active compounds.

Резюме: В това изследване е оценен приложният потенциал на водно-алкохолни екстракти от румънски диворастящи растения: корени от репей (*Arctium lappa*) и надземни части от персийско великденче (*Veronica persica*). Екстрактите са анализирани чрез ВЕТХ като количествено са определени 13 вещества в екстракта от *V. persica* и 6 в този от *A. lappa*, включително характерните за растението арктиин и арктигенин. Тоталните екстракти показват фунгицидна активност срещу *Aspergillus niger* и *Penicillium hirsutum*, като инхибиторните зони бяха с размер: 17.1 mm и 13.1 mm срещу *P. hirsutum*, 22 mm срещу *A. niger*, съответно. Цитогенетичният анализ оценен чрез *Allium cepa* тест разкрива редица хромозомни и ядрени аберации, предизвикани в меристемни коренови клетки. Включени в микроемулсии екстрактите показаха противовъзпалителен ефект, особено изразен при екстракта от великденче. Тези резултати очертават екстрактите от *A. lappa* и *V. persica* като обещаващи източници на биологично-активни молекули с противовъзпалителен ефект.

Fierascu I., Georgiev M.I., Ortan A.*, Fierascu R.C.*, Avramescu S.M., Ionescu D., Sutan A., Brinzan A., Ditu L.M. (2017) Phyto-mediated metallic nano-architectures via *Melissa officinalis* L.: synthesis, characterization and biological properties. *Scientific Reports*, 7: 12428 (ИФ₂₀₁₇ 4.122; Q1).

Abstract: The development of methods for obtaining new materials with antimicrobial properties, based on green chemistry principles has been a target of research over the past few years. The present paper describes the phyto-mediated synthesis of metallic nano-architectures (gold and silver) *via* an ethanolic extract of *Melissa officinalis* L. (obtained by accelerated solvent extraction). Different analytic methods were applied for the evaluation of the extract composition, as well as for the characterization of the phyto-synthesized materials. The cytogenotoxicity of the synthesized materials was evaluated by *Allium cepa* assay, while the antimicrobial activity was examined by applying both qualitative and quantitative methods. The results demonstrate the synthesis of silver nanoparticles (average diameter 13 nm) and gold nanoparticles (diameter of ca. 10 nm); the bi-metallic nanoparticles proved to have a core-shell flower-like structure, composed of smaller particles (ca. 8 nm). The Ag nanoparticles were found not active on nuclear DNA damage. The Au nanoparticles appeared nucleoprotective, but were aggressive in generating clastogenic aberrations in *A. cepa* root meristematic cells. Results of the antimicrobial assays show that silver nanoparticles were active against most of the tested strains, as the lowest MIC value being obtained against *B. cereus* (approx. 0.0015 mM).

Резюме: Разработването на методи за получаване на нови материали с антимикробни свойства, базирани на принципите на „зелената“ химия са обект на повишен интерес през последните години. В това проучване е описан метод за растително-базиран синтез на нано-материали (златни и сребърни) чрез етанолна екстракция на *Melissa officinalis* L. Оценката на фитохимичния състав на екстракта, както и на фито-синтезираните материали, е проведена чрез поредица от аналитични подходи. Цитогенотоксичността на синтезираните нано-материали е оценена чрез *Allium cepa* тест, докато антимикробната активност чрез качествени и количествени методи. Резултатите показват, че синтезираните сребърни наночастици (среден диаметър 13 nm) и златни наночастици (среден диаметър 10 nm), както и би-металните наночастици (среден диаметър 8 nm), са твърдо-обвити с цветовидна структура. Сребърните наночастици показват активност увреждаща ядрената ДНК. Златните наночастици показват нуклеопротективна активност, но генерират и агресивни кластогенни аберации в меристемни клетки от *Allium cepa*. Антимикробните тестове показват активност за сребърните наночастици, като най-ниски стойности на MIC са отчетени срещу *Bacillus cereus* (приблизително 0.0015 mM).

Marchev A.S.*, Dimitrova P., Koycheva I.K., **Georgiev M.I.*** (2017) Altered expression of TRAIL on mouse T cells *via* ERK phosphorylation by *Rhodiola rosea* L. and its marker compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 108: 419-428 (**ИФ**₂₀₁₇ **3.977**; **Q1**).

Abstract: *Rhodiola rosea* L. extracts have shown neuroprotective, anti-fatigue, anti-inflammatory and anti-tumor properties. However, the studies on their effect on T cell function are rather scarce. We examined the potential of *R. rosea* extract and its major constituents e salidroside, rosarin, rosavin and rosin to alter cell growth of human Jurkat T cells, apoptosis of splenic mouse CD3 T cells and expression of the surface markers and phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK). The initial screening for cell viability in Jurkat T cells and for apoptosis of mouse T cells showed the strongest activity for rosavin and rosarin. Rosarin and rosavin did not alter significantly the dynamic of CD69 expression upon stimulation, but altered TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression. Rosavin inhibited TRAIL upregulation, while rosarin showed an opposite effect. Indeed, rosarin increased the frequencies of CD3⁺TRAIL⁺ T cells and the fold inhibition of ERK phosphorylation. Our data showed that different effects of rosarin and rosavin on

TRAIL expression can involve distinct action on ERK signaling and hence highlighted their potential to manipulate TRAIL as a tool to rescue the resistance to apoptosis in autoimmune diseases and cancer.

Резюме: Екстрактът от *Rhodiola rosea* L. е познат със своите невропротективни, противовъзпалителни, противотуморни свойства, както и за премахване на намаляване на физическата и умствена умора. Въпреки това, изследванията по отношение на ефекта му върху функцията на Т-клетките са недостатъчни. В това проучване е оценен потенциалът на екстракт от *R. rosea* и неговите основни компоненти салидрозид, розарин, розавин и розин за повлияване клетъчния растеж на Jurkat Т-клетки, апоптозата на миши CD3 Т-клетки и експресията на повърхностни маркери и фосфорилирането на екстрацелуларната сигнал-регулирана киназа (extracellular signal-regulated kinase, ERK). Първоначалният скрийнинг за оценка на клетъчната жизненост на Jurkat Т-клетки показва, че основните молекули идентифицирани с екстракта от коренища на *R. rosea* дозо-зависимо повишават апоптозата, като с най-силна активност са розавин и розарин. Салидрозид и розин повлияват ранните прояви на Т-клетъчно активиране с промяна с динамиката на CD69 експресията, което на свой ред води до ускорена апоптоза. Розавин и розарин не повлияват значимо динамиката в експресията на CD69, но от друга страна повлияват експресията на TNF-свързан апоптозо-индуциращ лиганд (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL). Розавин инхибира свръхекспресията на TRAIL, докато розарин има противоположен ефект. Всъщност, розарин повиши честотата на CD3⁺TRAIL⁺ Т клетки и в пъти инхибира фосфорилирането на ERK. Получените данни очертават потенциала на тези молекули да модулират TRAIL като подход за преодоляване резистентността към апоптоза при някои автоимунни и ракови заболявания.

Chen L., Teng H., Zhang K.Y., Skalicka-Wozniak K., **Georgiev M.I.**, Xiao J.* (2017) Agrimonolide and desmethylagrimonolide induced HO-1 expression in HepG2 cells through Nrf2-transduction and p38 inactivation. *Frontiers in Pharmacology*, 7: 513 (**ИФ**₂₀₁₇ **3.831; Q1**).

Abstract: Agrimonolide and desmethylagrimonolide are the main bioactive polyphenols in agrimony with well-documented antioxidant, anti-diabetic, and anti-inflammatory potential. We report here for the first time that agrimonolide and desmethylagrimonolide stimulate the expression of phase II detoxifying enzymes through the Nrf2-dependent signaling pathway. Agrimonolide and desmethylagrimonolide also possess considerable protective activity from oxidative DNA damage. In order to explore the cytoprotective potential of agrimonolide and desmethylagrimonolide on oxidative stress in liver, we developed an oxidative stress model in HepG2 cells, and check the hypothesis whether Nrf2 pathway is involved. Western blotting and luciferase assay revealed that exposure of HepG2 cells to agrimonolide or desmethylagrimonolide leads to increased heme oxygenase-1 (HO-1) expression by activating ARE through induction of Nrf2 and suppression of Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1). Moreover, agrimonolide and desmethylagrimonolide also activated ERK signaling pathways and significantly attenuated individual p38 MAPK expression, subsequently leading to Nrf2 nuclear translocation. In conclusion, our results indicated that transcriptional activation of Nrf2/ARE is critical in agrimonolide and desmethylagrimonolide-mediated HO-1 induction, which can be regulated partially by the blockade of p38 MAPK signaling pathway and inhibiting nuclear translocation of Nrf2.

Резюме: АгримонOLID и десметилагримонOLID са основните биологично-активни полифеноли в камшика с добре проучени антиоксиданти, антидиабетни и противовъзпалителни ефекти. В нашето проучване за пръв път е описано стимулиращото действие на агримонOLID и десметилагримонOLID върху експресията на детоксикиращи ензими от фаза II, чрез повлияване на Nrf2-зависим сигнален път. За да оценим цитопротективния ефект на двете природни молекули срещу оксидативни увреждания в черния дроб, разработихме модел на оксидативен стрес на HepG2 клетъчна линия, и проверихме участието на Nrf2 пътя. Western blotting протеомният анализ и тестът с луцифераза разкриха в HepG2 третирани с агримонOLID и десметилагримонOLID повишена експресия на heme oxygenase-1 (HO-1) като следствие от активиране на ARE чрез индукция на Nrf2 и супресия на of Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1). В допълнение, двете съединения активират ERK сигнализацията и в значителна степен инхибират p38/MAPK експресията, което от своя страна води до ядрена транслокация на Nrf2. Обобщените резултати сочат транскрипционната активация на Nrf2/ARE като ключов механизъм за агримонOLID- и десметилагримонOLID-предизвиканата индукция на HO-1, която може частично да бъде повлияна чрез блокиране на p38/MAPK сигналения път и инхибиране на ядрената транслокация на Nrf2.

Vasileva L.V.*, Getova D.P., Doncheva N.D., Marchev A.S., **Georgiev M.I.** (2016) Beneficial effect of commercial *Rhodiola* extract in rats with scopolamine-induced memory impairment on active avoidance. *Journal of Ethnopharmacology*, 193: 586-591 (**ИФ**₂₀₁₆ **2.981; Q1**).

Abstract: *Rhodiola rosea* L., family Crassulaceae also known as Golden Root or Arctic root is one of the most widely used medicinal plants with effect on cognitive dysfunction, psychological stress and depression. The aim of the study was to examine the effect of a standardized commercial *Rhodiola* extract on learning and memory processes in naive rats as well as its effects in rats with scopolamine-induced memory impairment.

Materials and methods: Sixty male Wistar rats were used in the study. The experiment was conducted in two series - on naive rats and on rats with scopolamine-induced model of impaired memory. The active avoidance test was performed in an automatic conventional shuttle box set-up. The criteria used were the number of conditional stimuli (avoidances), the number of unconditioned stimuli (escapes) as well as the number of intertrial crossings.

Results: The chemical fingerprinting of the standardized commercial *Rhodiola* extract was performed by means of nuclear magnetic resonance (NMR). Naive rats treated with standardized *Rhodiola* extract increased the number of avoidances during the learning session and memory retention test compared to the controls. Rats with scopolamine-induced memory impairment treated with *Rhodiola* extract showed an increase in the number of avoidances during the learning session and on the memory tests compared to the scopolamine group. The other two parameters were not changed in rats treated with the extract of *Rhodiola* in the two series.

Conclusion: It was found that the studied *Rhodiola* extract exerts a beneficial effect on learning and memory processes in naive rats and rats with scopolamine-induced memory impairment. The observed effect is probably due to multiple underlying mechanisms including its modulating effect on acetylcholine levels in the brain and MAO-inhibitory activity leading to stimulation of the monoamines' neurotransmission. In addition the pronounced stress-protective properties of *Rhodiola rosea* L. could also play a role in the improvement of cognitive functions.

Резюме: *Rhodiola rosea* L. (Crassulaceae) още позната като златен корен или арктически корен е едно от най-широко използваните медицински растения ефективно при повлияване на когнитивни дисфункции, психологически стрес и депресия. Целта на изследването е да се проучи ефекта на стандартизиран екстракт от *Rhodiola* върху обучението и паметта на здрави плъхове и такива с модел на скополамин-индуцирана амнезия. Химичният отпечатък на стандартизирания екстракт е анализиран чрез метаболомика, базирана на ядрено-магнитния резонанс, като са идентифицирани характерните сигнали на редица първични и вторични метаболити, включително и на салидрозид. При тестовете за активно обучение, приложението на екстракта повишава броя активни избягвания (показател на заучаване) по време на 7-дневното обучение, както и при теста за памет върху здрави животни. При модела на скополамин-индуцирано паметово увреждане третираните с екстракт от *Rhodiola* плъхове показват подобрене в обучението спрямо моделната група. Тези резултати сочат ползотворния ефект на екстракт от *Rhodiola* върху обучението и паметта както при здрави, така и при плъхове със скополамин-индуцирана амнезия. Наблюдаваните поведенчески промени вероятно са резултат от множество механизми, включително и модулиране ацетилхолиновата медиация в мозъка и инхибиране на MAO ензимната активност. В допълнение, изразения анти-стрес ефект на *R. rosea* L. може да е от значение за подобряването на когнитивните функции.

Georgiev M.I.*, Alipieva K., Orhan I., Abrashev R., Denev P., Angelova M. (2011) Antioxidant and cholinesterases inhibitory activities of *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. and its phenylethanoid glycosides. *Food Chemistry*, 128: 100-105 (**ИФ**₂₀₁₁ **3.655**; **Q1**).

Abstract: The members of *Verbascum* L. (Scrophulariaceae) are known to be rich in phenylethanoid glycosides, and among them *Verbascum xanthophoeniceum* is an endemic plant species for the Balkan region, Northwestern, and Southern Turkey. A scheme was developed for the isolation of the main active constituents that accumulate in plant aerial parts. The antioxidant activities of total methanol extracts, collected phenylethanoid glycosides fractions and specific active constituents (forsythoside B, verbascoside and leucosceptoside B) were then evaluated in 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL}), hydroxyl radical averting capacity (HORAC_{FL}), ferric-reducing antioxidant power (FRAP), and superoxide anion radical scavenging assays. *In vitro* acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) inhibitory activities of abovementioned extracts, fractions and isolated pure compounds were also examined. Depending on the method used, forsythoside B, verbascoside and leucosceptoside B proved to be effective radical scavengers and cholinesterases inhibitors. On the basis of these findings it can be proposed that in addition to providing a potent source of antimicrobial and anti-inflammatory compounds, *Verbascum* plants could serve as attractive mines of powerful antioxidants for various purposes.

Резюме: Представителите на вид *Verbascum* L. (Scrophulariaceae) са познати с богато съдържание на фенилетаноидни гликозиди, сред които е и *Verbascum xanthophoeniceum* – ендемично растение за Балканския регион, Северозападна и Южна Турция. Разработена е схема за изолиране на основните активни компоненти, които растението натрупва в надземните си части. Антиоксидантната активност на тоталния метанолен екстракт, изолираните фракции с фенилетаноидни гликозиди и отделни активни компоненти (форситозид B, вербаскозид и левкосептозид B) е оценена чрез 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL}), hydroxyl radical averting capacity (HORAC_{FL}), ferric-reducing antioxidant power (FRAP), и

superoxide anion radical scavenging методи. *In vitro* ацетил- и бутирилхолинестеразната инхибиторна активност на горепосочените екстракт, фракции и изолирани чисти вещества също е изследвана. В зависимост от използвания метод, форситозид В, вербаскозид и леукосептозид В в различна степен показват ефективност като антиоксиданти и инхибитори на холинестеразите. На базата на тези резултати, видовете от род *Verbascum* могат да са освен източник на активни противомикробни и провитовъзпалителни молекули, така и на антиоксиданти за хранителната, козметичната и фармацевтичната индустрии.

Gyurkovska V., Alipieva K., Maciuk A., Dimitrova P., Ivanovska N., Haas C., Bley Th., **Georgiev M.I.*** (2011) Anti-inflammatory activity of devil's claw *in vitro* systems and their active constituents. *Food Chemistry*, 125: 171-178 (**ИФ**₂₀₁₁ **3.655; Q1**).

Abstract: Cell suspension and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy root cultures of Devil's claw (*Harpagophytum procumbens*), an African plant with high medicinal value, were cultivated in shake-flasks. A purification scheme to isolate their main active constituents (the phenylethanoid glycosides verbascoside, leucosceptoside A, β -OH-verbascoside and martynoside; structurally identified by NMR and LC-MS) was then developed, and their concentrations in the cultures were determined by UV spectrometry following HPLC separation. Preparations, extracts and the isolated phenylethanoid glycosides from the *H. procumbens in vitro* systems were tested on isolated murine macrophages to study their effects on nitric oxide (NO) and cytokine (TNF- α , IL-6) release and the expression of COX-1 and COX-2. They were also added to human serum to investigate their effects on the classical pathway of complement activation. The results indicate that the extracts and preparations of the *in vitro* systems, and pure verbascoside (their main active constituent), had strong anti-inflammatory properties, comparable to or even higher than that of pure harpagoside (a major anti-inflammatory constituent of intact Devil's claw tubers). Thus, they have potential as new anti-inflammatory agents.

Резюме: Клетъчна суспензия и *Agrobacterium rhizogenes*-трансформирани коренови култури от дяволски нокът (*Harpagophytum procumbens*), африканско растение с висока медицинска стойност, са култивирани в колби. Разработена е схема за пречистване и изолиране на активните им метаболити, в това число вербаскозид, левкосептозид А, β -хидрокси-вербаскозид и мартинозид, като структурното идентифициране е направено чрез ЯМР и течна хроматография в комбинация с маспектроскопия. Концентрациите на тези вторични метаболити в екстракта са определени чрез UV спектрометрия последвана от ВЕТХ разделяне. Търговски препарати, екстракти и изолирани фенолетаноидни гликозиди от *in vitro* култури на *H. procumbens* са тествани върху изолирани миши макрофаги по отношение ефекта им към продукцията на азотен оксид (NO) и цитокини (TNF- α и IL-6), както и експресията на циклооксигенази 1 и 2 (COX-1 и COX-2, съответно). В допълнение, са добавени и към човешки серум с цел да се оцени влиянието им върху класическия път за активиране на комплемента. Получените резултати разкриват, че екстрактът и препаратите от *in vitro* системи, както вербаскозида (основният активен компонент) имат силно изразени противовъзпалителни свойства, сравними и дори надвишаващи тези на харпагозид (най-активният противовъзпалителен компонент от дяволски нокът). Въпреки, че получените *in vitro* култури от *H. procumbens*, не продуцират харпагозид и харпагид, за който е докладвана известна токсичност, те могат да служат като източник на нови биологично-активни противовъзпалителни молекули с мощен ефект.

Vasileva L.V., Savova M.S., Amirova K.M., Dinkova-Kostova A.T., **Georgiev M.I.*** (2020) Obesity and Nrf2-mediated cytoprotection: where is the missing link? *Pharmacological Research*, 156: 104760 (**ИФ₂₀₁₉ 5.893; Q1**).

Abstract: The expanding dimensions of the global health crisis of overweight population has defined the term “globesity”. Among the most common pathological conditions connected with excessive adiposity are hyperglycemia, insulin resistance, dyslipidemia and hypertension which result in chronic non-communicable diseases (NCD) such as metabolic syndrome (MetS), type 2 diabetes (T2D), and nonalcoholic steatohepatitis (NASH). The contribution of inflammatory-immune reactions in obesity and its related co-morbidities is unequivocal. Increased levels of free fatty acids (FFA), reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) overloads the homeostatic system resulting in pro-inflammatory adipokines secretion, immune-activation and chronic inflammation in obesity. The cellular mechanisms of defense against oxidative stress are orchestrated by the transcription factor nuclear factor erythroid 2 p45-related factor 2 (NRF2). Excessive oxidative stress in the cell activates NRF2 which upregulates genes encoding major cytoprotective enzymes such as NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1), heme oxygenase 1 (HO1), and glutathione S-transferases (GST). The present review aims to clarify the interconnections between chronic inflammation, oxidative overload and NRF2-mediated cytoprotection as potential therapeutic approach in obesity.

Резюме: Нарастващото измерение на световната здравна криза със затлъстяващото население наложи възникването на термина “globesity”. Сред най-често срещаните заболявания, свързани със затлъстяването са хипергликемията, инсулиновата резистентност, дислипидемията и хипертонията, които водят до развитието на т.нар. хронични незаразни заболявания (chronic non-communicable diseases, NCD) като метаболитен синдром (MetC), захарен диабет тип 2 (Т2Д) и неалкохолна стеатохепатит (НАСХ). Участието на възпалително-имунните реакции при затлъстяването и свързаните с него заболявания е установено. Увеличените нива на свободните мастни киселини (СМК), реактивните кислородни радикали и реактивните азотни радикали претоварват поддържането на хомеостазата в организма, което води до отделяне на про-възпалителни адипокини, активиране на имунната система и хронично възпаление при затлъстяване. Клетъчно-медирианият защитен механизъм срещу оксидативен стрес се ръководи от транскрипционния фактор nuclear factor erythroid 2 p45-related factor 2 (NRF2). Прекомерният оксидативен стрес активира NRF2 в клетките, който от своя страна индуцира експресията на основни клетъчно-протективни ензими като NAD(P)H:хинон оксиредуктаза 1 (NQO1), хемоксигеназа 1 (HO1), и глутатион-S-трансфераза (GST). Настоящият обзор цели да изясни взаимовръзките между хроничното възпаление, оксидативният стрес и NRF2-опосредстваната клетъчна защита като потенциален подход в лечението на затлъстяването.

Vasileva L.V., Marchev A.S., **Georgiev M.I.*** (2018) Causes and solutions to “globesity”: the new fa(s)t alarming global epidemic. *Food and Chemical Toxicology*, 121: 173-193 (**ИФ₂₀₁₈ 3.775; Q1**).

Abstract: Diverse groups of factors are leading to increased weight gain and obesity, such as certain genetic phenotypes, neuroendocrine disturbances, the administration of some drugs, behavioral, social and environmental factors. The progressively escalating rates of overweight and obesity worldwide have led to an introduction of a new term “globesity”. Excessive accumulation of body fat and especially of visceral adipose tissue is the main pre-disposing

factor for the development of metabolic syndrome and other obesity related co-morbidities. At the present moment only few pharmacotherapeutics are used for long-term treatment of obesity acting on narrow target spectra, e.g. pancreatic and gastric lipase inhibition, acting as adrenomimetics or activating the satiety centers in hypothalamus. Plant-based medications that accelerate weight loss, proved to be safe, effective and widely available, would be a preferable alternative for anti-obesity treatments. As plant extracts are multi- component systems they could also act by more than one mechanism, including decreased lipid absorption, decreased energy intake, increased energy expenditure, decreased pre-adipocyte differentiation and proliferation, decreased lipogenesis and increased lipolysis.

The current review gives a summary of the risk factors for obesity development and its characteristics consequences. Current treatment options, combining lifestyle changes and conventional treatment with commercial anti-obesity drugs have been described as well. Special emphasis on in vitro, in vivo and human studies, of potential medicinal plant extracts and phytochemicals, such as polyphenols, terpenoids, alkaloids, saponins, able to modulate the molecular pathways and gene/protein expressions related to obesity, have been highlighted.

Резюме: Разнородна група фактори водят до натрупване на тегло и затлъстяване, като определени генетични фенотипни обусловености, невроендокринни нарушения, прием на някои лекарства, поведенчески, социални и екологични фактори. Продължителното увеличаване случаите на хора с наднормено тегло и затлъстяване по света водят до възникване на термина “globesity”. Прекомерното натрупване на мастна тъкан, особено във висцералната област е основния предразполагащ фактор за развитие на метаболитен синдром и други заболявания, съпътстващи затлъстяването. До момента, ограничен брой лекарства са одобрени за дългосрочната терапия при затлъстяване, имащи тесен спектър на действие, например, инхибитори на стомашната липаза, стимулиращи адренорецепторите или активиращи центъра на ситост в хипоталамуса. Лекарства на растителна основа, с доказана ефективност и безопасност и висока достъпност, са предпочитана алтернатива в съвременната терапия на затлъстяването. Тъй като растителните екстракти имат богат и разнообразен състав, могат да проявяват ефекта си по повече от един механизъм, включително понижаване усвояването на липидите, намален калориен прием, повишен разход на енергия, потискане диференциацията на преадипоцити и тяхното размножаване, намалено натрупване на липиди и повишаване на разграждането им (липолиза).

Настоящият обзор систематизира рисковите фактори за развитие на затлъстяването и характерните за него последици. Вариантите за лечение до момента, комбинирането на промяна в начина на живот и употреба на някой от одобрените медикаменти за затлъстяване също са описани. Обърнато е специално внимание на *in vitro*, *in vivo* и клиничните проучвания на екстракти от лечебни растения и техни съставки като полифеноли, терпеноиди, алкалоиди, сапонини потенциално повлияващи генната/протеиновата експресия на молекули участващи в развитието на затлъстяването.

Chen L., Teng H., Xie Z., Cao H., Cheang W.S., Skalicka-Wozniak K., **Georgiev M.I.**, Xiao J.* (2018) Modifications of dietary flavonoids towards improved bioactivity: An update on structure-activity relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(4): 513-527 (**ИФ**₂₀₁₈ **6.704; Q1**).

Abstract: Over the past two decades, extensive studies have revealed that inflammation represents a major risk factor for various human diseases. Chronic inflammatory responses predispose to pathological progression of chronic illnesses featured with penetration of

inflammatory cells, dysregulation of cellular signaling, excessive generation of cytokines, and loss of barrier function. Hence, the suppression of inflammation has the potential to delay, prevent, and to treat chronic diseases. Flavonoids, which are widely distributed in humans daily diet, such as vegetables, fruits, tea and cocoa, among others, are considered as bioactive compounds with anti-inflammatory potential. Modification of flavonoids including hydroxylation, o-methylation, and glycosylation, can alter their metabolic features and affect mechanisms of inflammation. Structure–activity relationships among naturally occurred flavonoids hence provide us with a preliminary insight into their anti-inflammatory potential, not only attributing to the antioxidant capacity, but also to modulate inflammatory mediators. The present review summarizes current knowledge and underlies mechanisms of anti-inflammatory activities of dietary flavonoids and their influences involved in the development of various inflammatory-related chronic diseases. In addition, the established structure–activity relationships of phenolic compounds in this review may give an insight for the screening of new anti-inflammatory agents from dietary materials.

Резюме: През последните две десетилетия, обстойни проучвания стигат до извода, че възпалението представлява огромен рисков фактор при различни заболявания. Хроничните възпалителни отговори предразполагат към прогресия на съществуващите хронични заболявания, което се осъществява чрез проникване на имунни клетки на възпалението, нарушено регулиране на междуклетъчната комуникация, натрупване на излишно количество цитокини и загуба на бариерна функция. От което следва, че потискането на възпалението може да забави, предотврати или да лекува хроничните заболявания. Флавоноидите, които се приемат като биологично активни молекули с противовъзпалителен потенциал, са широко представени в човешката ежедневна диета, например в зеленчуците, плодовете, чаят и какаото. Промяна в структурата на флавоноидите, включително хидроксилиране, O-метиране и гликозилиране могат да променят техните метаболитни свойства и да повлияят механизма им на действие при възпаление. Информация за връзката структура-активност за естествено срещаните флавоноиди предоставя предварително информация за техния противовъзпалителен потенциал, не само по отношение на антиоксидантната им способност, но и възможността им да повлияват възпалителните медиатори. Настоящият обзор предоставя актуални данни и акцентира върху механизма на противовъзпалително действие на приетите чрез храната флавоноиди и влиянието им върху развитието на разнообразните хронични заболявания, свързани с възпалението. В допълнение, обобщените в изложението данни за връзката структура-активност при фенолните съединения могат да бъдат отправна точка за търсене за нови противовъзпалителни молекули набавяни с храната.

Marchev A.S., Dimitrova P.A., Burns A.J., Kostov R.V., Dinkova-Kostova A., **Georgiev M.I.*** (2017) Oxidative stress and chronic inflammation in osteoarthritis: can Nrf2 counteract these partners in crime? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1401: 114-135 (**ИФ**2017 **4.277**; **Q1**).

Abstract: Osteoarthritis (OA) is an age-related joint degenerative disease associated with pain, joint deformity, and disability. The disease starts with cartilage damage but then progressively involves subchondral bone, causing an imbalance between osteoclast-driven bone resorption and osteoblast-driven remodeling. Here, we summarize the data for the role of oxidative stress and inflammation in OA pathology and discuss how these two processes are integrated during OA progression, as well as their contribution to abnormalities in cartilage/bone metabolism and integrity. At the cellular level, oxidative stress and inflammation are counteracted by transcription factor nuclear factor erythroid p45-related

factor 2 (NRF2), and we describe the regulation of NRF2, highlighting its role in OA pathology. We also discuss the beneficial effect of some phytonutrients, including the therapeutic potential of NRF2 activation, in OA.

Резюме: Остеоартритът (ОА) е възрастово-обусловено дегенеративно ставно заболяване, съпроводено с болка, деформация на ставите и обездвижване. Заболяването започва с увреждане на хрущяла, което в последствие обхваща и костта, намираща се непосредствено под хрущяла, което води до нарушен баланс между остеокласт-предизвиканото разграждане на костно вещество и остеобласт-предизвиканото възстановяване на костната тъкан. В настоящия обзор са обобщени данните за ролята на оксидативния стрес и възпалението при ОА и се обсъжда как тези два процеса си взаимодействат по време на прогресията на заболяването, както и техния принос за нарушения метаболитизъм и интегритета в хрущялната и костна тъкани. На клетъчно ниво, на оксидативния стрес и възпалението се противодейства чрез активиране на транскрипционен фактор nuclear factor erythroid p45-related factor 2 (NRF2), и ние описваме подходи за регулацията на NRF2, с акцент върху ролята му в патологията на ОА. Обсъдени са и благоприятните ефекти на някои храни от растителен произход, включително и терапевтичния им потенциал чрез активиране на NRF2, при ОА.