

**-Списък на научните публикации, с абстракти
(на български и английски език)
на гл. ас. д-р Андрей С. Марчев
за участие в конкурс за доцент**

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

Списъкът съдържа **43 научни труда**, от които 1 полезен модел, 4 глави от книги, 27 публикации в реферирани и индексирани списания в световно известни бази данни с научна информация (13 в Q1, 6 в Q2 и 3 в Q3 и 1 в Q4) с общ **импакт фактор 83.18** и 11 в нереперирани списания с научно рецензиране или в редактирани колективни томове. В 17 от представените научни трудове гл. ас. д-р Марчев е водещ или кореспондиращ автор.

Полезен модел

1. Георгиев М., **Марчев А.**, Бенина М., Амирова К., Гечев Ц. (2021) Хранителна среда за *in vitro* размножаване на растения от вида *Haberlea rhodopensis* Friv. *Патентно ведомство на Република България*, регистрационен № 3980 U1.

Резюме:

Полезният модел се отнася до състав за хранителна среда за *in vitro* размножаване на растението *Haberlea rhodopensis* Friv. за нуждите на фармацевтичната промишленост.

Задачата на полезния модел е да предложи състав за хранителна среда за *in vitro* размножаване на *H. rhodopensis*, който да позволи ускореното му размножаване в контролирани и асептични условия през цялата година, независимо от климатичните условия и сезона, да води до повишаване на количеството на фенолетаноидни гликозиди, в частност миконозид в листата и същевременно с това да лимитира изчерпването на естествените местообитания на растението, което е от особено значение за този застрашен растителен вид.

Монографии и глави от книги

2. **Marchev A.**, Yordanova Z., Georgiev M.* (2018) Transformed root culture: From genetic transformation to NMR-based metabolomics. In: *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol. 1815 (Layola-Vargas V., Ochoa-Alejo N., Eds.), pp. 457-474. Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature. ISBN: 9781493985937.

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:

Трансформираните коренови култури, тип „hairy root“ (HR) се считат за „зелени фабрики“, използвани за получаване на биомаса и биологично активни молекули с фармацевтично значение. Като такива, трансформираните коренови култури имат огромен потенциал като важна биотехнологична платформа за изясняване на биосинтетичните пътища на вторичните метаболити, физиологичните процеси, както и получаването на рекомбинантни терапевтични протеини. Въпреки това, някои растителни видове са трудно податливи за получаване на трансформирани корени чрез класическите подходи на генетична трансформация с *Agrobacterium rhizogenes*. *Agrobacterium*-медираната генетична трансформация и третиране с ултразвук (SAArT) е високо ефективен метод, който осигурява прехода на бактериалния плазмид в целевата растителна тъкан и включва третиране на растителните експланти за кратко време с ултразвук.

Метаболомиката базирана на ядрено-магнитният резонанс (ЯМР) е една от най-мощните и подходящи платформи за идентифициране и получаване на структурна информация за широк спектър от съединения с висока аналитична прецизност. ЯМР метаболомиката се използва за определяне на фитохимични вариации в лечебни растения или фуражни култури в определена околна среда и условия, включително биотичен стрес, структурно определяне на природните продукти, контрол на качеството на билкови препарати или хранителни добавки и сравнение на метаболитните разлики между растенията и техните *in vitro* култури.

Тук обобщаваме знания и опит в индуцирането на HR от редки растителни видове чрез SAArT техника и в следствие екстракция на вторични метаболити с умерена до висока полярност и тяхното идентифициране чрез ЯМР метаболомен анализ.

3. Marchev A., Georgiev M.* (2016) Plant cell bioprocesses. In: *Current Developments of Biotechnology and Bioengineering. Bioprocess, Bioreactors and Controls* (Larocche C., Sanroman M., Du G., Pandey A., Eds.), pp. 73-95. Elsevier. ISBN: 9780444636744.

Abstract:

Plant cell cultures (PCCs) offer sustainable production systems for high-value pharmaceuticals, cosmetics, and health and food ingredients, and exert an essential role in human diet and health care. These include secondary metabolites (SMs) with proven anticancer, antiinflammatory, hepatoprotective, antiviral, antimicrobial, repellent, and antioxidant properties, including proteins, antibodies, vaccines, pesticides, flavonoids, saponins, alkaloids, terpenoids, anthocyanins, betalains, etc. Their growing commercial importance has created enhanced interest in biosynthesis through biotechnological systems. The potential of plant *in vitro* cultures for the production of important food and medicinal ingredients has been admitted for a long time. Compared with intact plant production, PCCs have numerous advantages. They are able to produce SMs from the mother plant because of their totipotency. Possible cultivation

under defined conditions avoids several restrictions such as geographical factors (climate change, soil conditions, and crop variations) and ecological factors (work with endangered or restricted plant species, which can erode their genetic diversity). Another advantage is the scale-up and optimization of the cultivation conditions to improve SM yield, keeping rigid control of process parameters according to good manufacturing practice (GMP), thus ultimately providing the continuous production of biosafety (the absence of pesticides and human/animal pathogens) and bioactive and stable natural products. From an economic perspective, the cultivation of PCCs has shorter production cycles, simpler and less expensive downstream processes for extraction, and purification of SMs from the biomass or the culture medium.

Резюме:

Растителните клетъчни култури (PCCs) се използват като устойчиви системи за биосинтез на биологично активни молекули, които имат важно значение като компоненти във фармацевтични и козметични препарати, а също така и съществена роля в диетата и здравето на хората. Голяма част от тези активни молекули са вторични метаболити, които притежават антинеопластична, противовъзпалителна, хепатопротективна, антивирусна, антимикробна и антиоксидантна активности и включват протеини, антитела, ваксини, пестициди, флавоноиди, сапонини, терпени, антоциани, беталаини и др. Нарастващата им търговска стойност повишава интереса за тяхното получаване от растителни *in vitro* системи. Потенциалът на тези растителни системи за получаването на компоненти с важна медицинска и хранителна стойност е признат много отдавна. В сравнение с растенията, PCCs имат много предимства. Те са способни да синтезират вторични метаболити характерни за майчиното растение, заради тяхната тотипотенция. Възможностите за култивиране при контролирани условия преодоляват някои ограничения, като географски фактори (климатични промени и почвен състав), както и екологични такива (работа със застрашени растителни видове, което може да доведе до намаляване на видовото разнообразие). Друго предимство е възможността за едро-машабно култивиране и оптимизиране на условията на култивиране за повишаване на добива на вторични метаболити, при спазване на добрите производствени практики, водейки до непрекъснатото получаване на безопасни (отсъствие на пестициди и патогени) и биоактивни природни продукти. От икономическа гледна точка използването на PCCs е също удчано, тъй като те имат по-кратки производствени цикли, улеснена екстракция и пречистване на метаболитите от културалната среда.

4. Dzhambazova T., Badjakov I., Dincheva I. Georgieva M., Tsvetkov I., Pavlov A., **Marchev A.**, Mihalev K., Ivanov G., Kondakova V., Batchvarova R., Atanassov A.* (2014) Omics technologies – new approaches for detection of unique qualities of small fruits. In: *Omics Technologies and Crop Improvement* (Benkeblia N., Ed.), pp. 187-208. CRC Press, Taylor & Francis Group. ISBN: 9781466586680.

Abstract:

The omics disciplines applied in the context of nutrition and health have the potential to deliver biomarkers for health and comfort, reveal early indicators of disposition to disease, and discover bioactive, beneficial food components. These technologies are aimed at unraveling the overall expression of genes, proteins, and metabolites in a functionally relevant context, and provide insights into the molecular basis of various fundamental processes involved in growth and development of plants and their environment.

Резюме:

Прилагането на омикс платформите по отношение на здравето и храненето имат потенциал за формирането на маркери, които могат да се използват за ранна диагностика на заболявания и разкриването на полезни, биоактивни хранителни компоненти. Тези технологии целят разкриването на цялостната експресия на гени, протеини и метаболити, а също така и да осигурят по-задълбочени молекулни познания за някои фундаментални процеси, свързани с растежа и развитието на растенията в тяхната среда.

5. Georgiev V., **Marchev A.**, Berkov S., Pavlov A.* (2013) Plant *in vitro* systems as sources of tropane alkaloids. In: *Hand Book of Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes* (Ramawat K., Mérillon J-M., Eds.), pp. 173-211. Springer. ISBN: 9783642221439.

Abstract:

Tropane alkaloids are frequently used in medicine because of their valuable pharmacological activities. To this group belong hyoscyamine, its racemate atropine, scopolamine, and cocaine. Hyoscyamine and scopolamine are widely applied as parasympatholytic agents who antagonize acetylcholine binding in a competitive manner. Therapeutic doses of atropine possess antispasmodic properties and are used in treatment of cardiac and gastrointestinal diseases. It is used to treat acute bronchitis, to control the symptoms of Parkinson's disease, and as an antidote in cases of poisoning by organophosphates. The better activity on the central nervous system at lower therapeutic doses of scopolamine supported with less side-effect than atropine determines its greater demand on the market than hyoscyamine and atropine.

Резюме:

Тропановите алкалоиди се използват често в медицината, заради ценните си фармакологични активности. Към тази група алкалоиди спадат хиосциамин, атропин, скополамин и кокаин. Хиосциамин и скополамин се използват широко като парасимпатиколицити и възпрепятстват свързването на ацетилхолина по конкурентен път. В подходящи терапевтични дози атропина притежава антиспазматично действие и се използва при третирането на сърдечни и гастроинтестинални нарушения. Използва се при лечението на остър бронхит, за контролиране симптомите на болеста на Паркинсон и като антидот при отравяне с органофосфатни съединения. Скополамин е много повече търсен на пазара, поради това, че има по-добър ефект върху действието на централната нервна система, а също така и по-малкото странични ефекти в сравнение с хиосциамин и атропина.

Научни публикации в издания, които са реферирани и индексирани в световно известни бази данни с научна информация

6. Sieniawska E.*, Sawicki R., Truszkiewicz W., **Marchev A.**, Georgiev M. (2021) Usnic acid treatment changes the composition of *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope and alters bacteria redox status. *mSystems*, accepted (**ИФ2019 6.280; Q1**).

Abstract:

Mycobacterium tuberculosis developed efficient adaptation mechanisms in response to different environmental conditions. This resulted in ability to survive in human macrophages and in resistance to numerous antibiotics. To get insight into bacterial response to potent antimycobacterial natural compounds, we tested how usnic acid, a lichen-derived secondary metabolite, would influence mycobacteria at transcriptomic and metabolomic level. The analysis of expression of sigma factors revealed a profound impact of usnic acid on one of the

primary genetic regulatory system of *M. tuberculosis*. Combined LC-MS and NMR analyses allowed to observe the perturbations in metabolic pathways, as well as in lipid composition, which took place within 24 h of exposure. Early bacterial response was related to redox homeostasis, lipid synthesis and nucleic acids repair. Usnic acid treatment provoked disturbances of redox state in mycobacterial cells and increased production of structural elements of cell wall and cell membrane. In addition, to increase in molecules related to restoration of redox balance, the rearrangements of cell envelope were the first defence mechanisms observed under usnic acid treatment.

Резюме:

Mycobacterium tuberculosis успява да развие различни адаптивни механизми в отговор на различни въздействия идващи от околната среда. Това води до увеличаване на нейната преживяемост в човешките макрофаги, както и на резистентността към много антибиотици. За да се разбере бактериалния отговор към потенциални антимикробни природни вещества е изследвано влиянието на usnic acid (изолирана от лишей) върху мукобактерията на транскрипционно и метаболитно ниво. Анализът на експресията на сигма факторите поазва, че киселината има съществено влияние върху генетичната регулаторна система на *M. tuberculosis*. Комбинираното приложение на ТХ-МС и ЯМР дават възможност да се наблюдават нарушенията в метаболитните пътища, а също така и липидния състав в рамките на 24 часа от третирането с киселината. Ранният бактериален отговор е свързан с редокс хомеостазата, липидния синтез и възстановяването на нуклеиновите киселини. Третирането с киселината провокира дисбаланс в редокс хомеостазата на мукобактерията и повишава продукцията на структурни елементи от клетъчната стена и клетъчната мембрана. В допълнение на това, с цел да се възстанови редокс баланса, като първи защитен механизъм в резултата от третирането с киселината се наблюдават промени в клетъчната обвивка на бактерията.

7. **Marchev A.,** Vasileva L., Amirova K., Savova M., Koycheva Y., Balcheva-Sivenova Zh., Vasileva S., Georgiev M.* (2021) Rosmarinic acid-From bench to valuable applications in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, DOI: 10.1016/j.tifs.2021.03.015 (ИФ₂₀₁₉ 11.077; Q1).

Abstract:

Rosmarinic acid (RA) is widely distributed in plant species of Lamiaceae and Boraginaceae families, among others. Structurally RA is an ester of caffeic acid and 3,4-dihydroxyphenyllactic acid with well explored biosynthetic pathway, physiological functions in plants and (potential) biological activities. Great number of herbal preparations and food supplements, containing RA, are marketed with claims for beneficial health effects. Furthermore, due to the inhibition of lipid peroxidation and bacterial growth, RA is approved for use as natural antioxidant and/or preservative in food industry. The present review will explore the contemporary biotechnological approaches for RA mass-production and will attempt to summarize its main biological properties based on recent studies. Future applications in food industry and potential functional food development will be proposed. Implications for technological and chemical modification of RA aiming to improve its bioavailability will be presented. The advances in biotechnological production of RA provide effective and “green” approach which worth further implementation to a large-scale application. Numerous *in vitro* and *in vivo* studies confirm many of the claimed health-promoting effects of RA, as well as, its value as food additive. Despite the recent improvements in RA stability and bioavailability, its use in food products should be thoroughly evaluated until a tight balance between safety and efficiency is set.

Резюме:

Розмариновата киселина (RA) е широко разпространена в растителните видове от семейство Lamiaceae и Boraginaceae. В структурно отношение RA е естер на кафеената киселина и 3,4-дихидроксибензилмолчната киселина с добре изучен биосинтетичен път, физиологични функции в растенията и (потенциални) биологични активности. Голям брой търговски препарати, в това число и хранителни добавки, съдържащи RA са на пазара, декларирайки различни нейни здравословни ползи. Поради свойствата си да инхибира липидната пероксидация и бактериален растеж, RA е одобрена за използване като природен антиоксидант и/или консервант в хранителната индустрия. Тази обзорна статия цели обобщаване на съвременните биотехнологични подходи за биосинтез на RA, както и на нейните най-важни биологични активности. Наред с това са предложени и възможности за приложение на RA в създаването на функционални храни. Представени са възможности за биотехнологично и химично модифициране на тази молекула, с което се цели подобряване на нейната бионаличност. Обобщени са новостите в биотехнологичното получаване на RA, както и възможностите за едро-машабно култивиране. Голям брой *in vitro* и *in vivo* изследвания потвърждават здравословните ползи от приема на RA, което повишава нейната стойност като хранителна добавка. Въпреки многото подобрения в стабилността и бионаличността на RA, нейната употреба в хранителните продукти трябва да се случва само след пълна оценка и установяване на баланса между нейната ефикасност и безопасност.

8. Amirova K., Dimitrova P., **Marchev A.**, Krustanova S., Simova S., Alipieva K., Georgiev M.* (2021) Biotechnologically-produced myconoside and calceolarioside E induce Nrf2 expression in neutrophils. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4): 1759 (ИФ₂₀₁₉ 4.556; Q2).

Abstract:

The pathological manifestation of various diseases can be suppressed by the activation of nuclear factor erythroid 2 p45-related factor 2 (Nrf2), a transcriptional regulator of the cellular redox balance. *Haberlea rhodopensis* Friv. is a resurrection plant species endemic for Bulgaria, containing biologically active phenylethanoid glycosides that might possess antioxidant or redox activity. This study aimed to analyze the metabolic profile of *in vitro* cultured *H. rhodopensis* and to identify molecules that increase Nrf2 expression in bone marrow neutrophils. Fractions B, D, and E containing myconoside, or myconoside and calceolarioside E in ratios 1:0.6 and 0.25:1 were found to be the most active ones. Fraction B (200 µg/mL) improved neutrophil survival and strongly increased the Nrf2 intracellular level, while D and E, as well as, myconoside and calceolarioside E at the same ratios had a superior effect. Calceolarioside E (32 µg/mL) had stronger activity than myconoside, the effect of which was very similar to that of 2-cyano-3,12-dioxo-oleana-1,9(11)-dien-28-oic acid methyl ester (CDDO-Me), used as a positive control. These data indicate that both molecules, used alone or in combination have stimulatory activity on the endogenous Nrf2 level, indicating their therapeutic potential to regulate the cellular redox homeostasis oxidative stress-associated pathologies.

Резюме:

Патологичната проява на различни заболявания може да бъде потисната чрез активиране на ядрения фактор еритроид 2, свързан с p45 фактор 2 (Nrf2), който се явява транскрипционен регулатор на антиоксидантния баланс в организма. *Haberlea rhodopensis* Friv. е ендемичен за България възкръсващ растителен вид, съдържащ

биологично активни фенилетаноидни гликозиди, които притежават антиоксидантна активност. Проведено е метаболитно профилиране посредством метаболомика базирана на ядрено-магнитния резонанс на *in vitro* култивирани растения *H. rhodopensis*, както и идентифициране на молекулите, които увеличават експресията на Nrf2 в неутрофилите, изолирани от костен мозък на мишки. След проведено фракциониране е установено, че фракции В, D и Е, които съдържат миконозид или миконозид и калцеолариозид Е в съотношения 1:0.6 и 0.25:1 имат най-висока активност. Фракция В (200 µg/mL) подобрява преживяемостта на неутрофилите и силно увеличава експресията на Nrf2, докато фракции D и Е, както и приложените самостоятелно или в съотношение миконозид и калцеолариозид Е имат още по-добър ефект. Калцеолариозид Е (32 µg/mL) има по-висока активност от миконозид, чийто ефект е много подобен на този на 2-циано-3,12-диоксо-олеана-1,9(11)-диен-28-оинова киселина метилов естер (CDDO-Me), използван като положителна контрола. Тези данни показват, че и двете молекули, използвани самостоятелно или в комбинация стимулират активността на Nrf2. Това показва техният терапевтичен потенциал за регулиране на патологични процеси, свързани с оксидативния стрес и регулиране на клетъчната хомеостаза.

9. **Marchev A.***, Koycheva I., Aneva I., Georgiev M. (2020) Authenticity and quality evaluation of different *Rhodiola* species and commercial products based on NMR-spectroscopy and HPLC. *Phytochemical Analysis*, 31(6): 756-769 (**ИФ₂₀₁₉ 2.772; Q1**).

Abstract:

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

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*.

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.

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:

Важен въпрос за крайните потребители е автентичността и качеството на търговските продукти от *Rhodiola rosea* L. (*Sedum rosea* (L.) Scop.), поради възможността за тяхното фалшифициране с други видове *Rhodiola*. Разработена е надеждна и практична аналитична платформа за качествено и количествено определяне 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 доказване автентичността на търговски препарати на база *R. rosea*.

Основните молекули (*p*-тирозол, салидрозид, розавин, розин и розарин) са идентифицирани чрез използването на едно- и двуменсионна метаболомика, базирана на ядрено-магнитния резонанс (ЯМР), съчетана с количествено определяне чрез високоефективна течна хроматография с UV/VIS детекция. Дискриминационния анализ на ортогоналната проекция на латентните структури (OPLS-DA) е използван за определяне на специфичните молекули 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. Получените данни 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 стадии от производството на търговските продукти.

10. Dimitrova P., Alipieva K.*, Grozdanova T., Leseva M., Gerginova D., Simova S., **Marchev A.**, Bankova V., Georgiev M., Popova M. (2020) *Veronica austriaca* L. extract and arbutin expand mature double TNF- α /IFN- γ neutrophils in murine bone marrow pool. *Molecules*, 25(15): 3410 (ИФ₂₀₁₉ 3.267; Q2).

Abstract:

Plants from the *Veronica* genus are used across the world as traditional remedies. In the present study, extracts from the aerial part of the scarcely investigated *Veronica austriaca* L., collected from two habitats in Bulgaria-the Balkan Mountains (Vau-1) and the Rhodopi Mountains (Vau-2), were analyzed by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. The secondary metabolite, arbutin, was identified as a major constituent in both extracts, and further quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC), while catalpol, aucubin and verbascoside were detected at lower amounts. The effect of the extracts and of pure arbutin on the survival of neutrophils isolated from murine bonemarrow (BM) were determined by colorimetric assay. The production of cytokines-tumor necrosis factor (TNF)- α and interferon (IFN)- γ was evaluated by flowcytometry. While Vau-1 inhibited neutrophil vitality in a dose-dependent manner, arbutin stimulated the survival of neutrophils at lower concentrations, and inhibited cell density at higher concentrations. The Vau-1 increased the level of intracellular TNF- α , while Vau-2 and arbutin failed to do so, and expanded the frequency of mature double TNF- α ⁺/IFN- γ ^{hi} neutrophils within the BM pool.

Резюме:

Растенията от род *Veronica* се използват в народната медицина на страни от цял свят. В настоящото изследване е проведена фотохимична характеристика чрез ЯМР-базирана метаболомика на растителни екстракти от въздушни части на един слабо проучен вид в това отношение *Veronica austriaca* L., събран от две местообитания в България – Стара планина (Vau-1) и Родопи (Vau-2). Арбутин (308.2-382.9 $\mu\text{g/g}$) е идентифициран като основен вторичен метаболит и в двата екстракта, както и количествено анализиран чрез високоефективна течност хроматография (ВЕТХ), докато катапол, аукубин и

вербаскозид са открити в по-ниски количества. Влиянието на екстрактите и чист арбутин върху оцеляването на неутрофилите, изолирани от костен мозък на мишки е определено чрез колориметричен анализ. Продуцирането на цитокини, като тумор некрозис фактор (TNF)- α и интерферон (IFN)- γ е анализирано чрез проточна цитометрия. Докато Vau-1 инхибира неутрофилната жизнестойност по дозозависим начин, арбутинът стимулира преживяемостта на неутрофилите при по-ниски концентрации и инхибира клетъчния растеж при по-високи концентрации. Vau-1 увеличава нивата на вътреклетъчен TNF- α , докато при Vau-2 и арбутин не се наблюдава подобна зависимост и водят до увеличаване честотата на зрели TNF- α ⁺ / IFN^{hi} неутрофили.

11. Hinkov A.*, Angelova P., **Marchev A.**, Hodzev Y., Tsvetkov V., Dragolova D., Todorov D., Shishkova K., Kapchina-Toteva V., Blundell R., Shishkov S., Georgiev M. (2020) *Nepeta nuda* ssp. *nuda* L. water extract: Inhibition of replication of some strains of human alpha herpes virus (genus simplex virus) *in vitro*, mode of action and NMR-based metabolomics. *Journal of Herbal Medicine*, 21: 100334 (**ИФ**₂₀₁₉ **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 (CC₅₀ = 7.35 mg/ml \pm 0.06) and 72 h (CC₅₀ = 4.488 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 (EC₅₀ of 0.66 mg/ml \pm 0.04 and 0.788 mg/ml \pm 0.009 for the F and the DD strains, respectively, measured via colorimetric assay). The IC₅₀ value was 0.181 mg/ml \pm 0.073 and 0.0888 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 използва в традиционната медицина поради характерните за нея диуретични, анти-асматични, антиоксидантни, спазмолитични, седативни и аналгетични

свойства (дължащи се на съдържащите се в растението непеталактони). В настоящето изследване е проучен *in vitro* 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). Екстрактът показва изразена анти-херпесна активност при двата използвани теста (МТТ-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. Съгласно проведените експерименти, вероятно това е по-скоро свързано с промяна в абсорбцията, отколкото с проникването на вируса в клетката. 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, ванилова, кафеена, протокатехова, ферулова и цинамова киселини; докато флавоноидите са представени предимно от цирсимаритин, хризеориол, ванилин, рутин и кверцетин.

12. **Marchev A., Yordanova Z., Georgiev M.*** (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 като надежен източник на храна, овкусителни, оцветители и компоненти с приложение във фармацевтичната промишленост. Естествени местообитания на растенията, обаче бързо се изчерпват, поради изменението на климата и развиващото се земеделие. Растителните биотехнологии предлагат устойчив подход за биопродукция на растителни вторични метаболити, използвайки растителните *in vitro* системи. Уникалната структурна характеристика на вторичните метаболити от растителен произход, техният безопасен профил, широк спектър на действие и „метаболитно предпочитане“ доведоха до създаването на много лекарствени препарати на основата на медицински растения, които са приблизително една четвърт от всички лекарства, одобрени от Агенцията по храните и лекарствата на САЩ и/или Европейската агенция по лекарствата. Все още има много предизвикателства, които трябва да се преодолеят в подобряване на производството на тези метаболити от растителни *in vitro* системи и установяване на устойчивост при мащабирането на биотехнологичния процес. Тези предизвикателства се дължат на особеностите на растителния клетъчен метаболизъм, комплексността на биосинтетичните пътища на вторичните метаболити, както и на правилния подбор на биореакторни системи и оптимизиране на биопроцеса. Начините за подобряване на биосинтеза на тези ценни молекули от растителни *in vitro* системи, включват метаболитно инженерство и CRISPR/Cas9 технологията за регулиране на растителния метаболизъм чрез свръхекспресия/репресия на единични или група от гени или транскрипционни фактори. Използването на ЯМР-базирана метаболомика за мониторинг на количествата на метаболитите, както и като инструмент за изследване на динамиката на клетъчния метаболизъм е дискутирано в този обзор. Различни видове биореакторни системи, тяхната модификация и оптимални параметри на култивиране при лабораторно или индустриално производство на растителните вторични метаболити са също акцентирани.

13. Marchev A., Georgiev M.* (2020) Plant *in vitro* systems as a sustainable source of active ingredients for cosmeceutical application. *Molecules*, 25(9): 2006 (ИФ₂₀₁₉ 3.267; Q2).

Abstract:

Cosmeceuticals are hybrids between cosmetics and pharmaceuticals which are being designed for a dual purpose: (1) To provide desired esthetical effects and (2) simultaneously treat dermatological conditions. The increased demand for natural remedies and the trends to use natural and safe ingredients resulted in intensive cultivation of medicinal plants. However, in many cases the whole process of plant cultivation, complex extraction procedure, and purification of the targeted molecules are not economically feasible. Therefore, the desired production of natural cosmetic products in sustainable and controllable fashion in the last years led to the intensive utilization of plant cell culture technology. The present review aims to highlight examples of biosynthesis of active ingredients derived through plant *in vitro* systems with potential cosmeceutical application. The exploitation of different type of extracts used in a possible cosmeceutical formulation, as well as, their activity tested in *in vitro/in vivo* models is thoroughly discussed. Furthermore, opportunities to manipulate the biosynthetic pathway, hence engineering the biosynthesis of some secondary metabolites, such as anthocyanins, have been highlighted.

Резюме:

Козметиците са хибридни продукти между козметичен и фармацевтичен продукт, чиито основни предназначения са: (1) осигуряване на желан естетичен ефект и (2) в същото време лечение на дерматичен проблем. Повишеното търсене на природни продукти и тенденциите за използване на природни и безопасни съставки в тях доведоха до интензивната употреба на лечебните растения. В много случаи обаче, целия процес на култивиране на растенията, сложната процедура по екстракция и пречистване на целевите молекулите не е икономически изгоден. Следователно, желаното производство на натурални козметични продукти през последните години доведоха до интензивното използване на растителните клетъчни биотехнологии. Настоящият обзор има за цел да подчертае подходящи примери за биосинтеза на активни метаболити, получени от растителни *in vitro* системи с потенциално приложение в козметиката. Експлоатацията на различни видове екстракти, използвани в козметични формули, а също така и изследване на тяхната активност в различни *in vitro/in vivo* модели е също дискутирана. Освен това, е акцентирано върху възможностите за манипулиране на биосинтетичния път и целево стимулиране на биосинтеза на някои вторични метаболити, като антоцианини например.

14. Amirova K., Dimitrova P., **Marchev A.**, Aneva Y., Georgiev M.* (2019) *Clinopodium vulgare* L. (wild basil) extract and its active constituents modulate cyclooxygenase-2 expression in neutrophils. *Food and Chemical Toxicology*, 124: 1-9 (ИФ₂₀₁₉ **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 широк спектър от етнофармакологични приложения, продуциращо разнородни по химична структура 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 дори и в иновативни противотуморни и имунни терапии. В наши дни, селективните и нови COX-2 инхибитори от растителен произход с безопасен профил 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 СОХ-2 експресия и апоптоза на миши неутрофили. Екстрактът CVE, кафеената и хлорогенова киселини потискат експресията на СОХ-2, индуцирана от зимозан в неутрофили изолирани от костен мозък и 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 СОХ-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. Получените данни показват, че екстрактът от котешка стъпка може да служи като източник на нови растителни молекули с противовъзпалителна активност.

15. Vasileva L.*, Saracheva K., Ivanovska M., Petrova A., **Marchev A.**, Georgiev M., Murdjeva A., Getova D. (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 и анти-депресантна активност. Изследван е ефектът на салидрозид (5.0 mg/kg перорално) и куркумин (20.0 mg/kg перорално) приложени, както самостоятелно така и в комбинация (5.0 mg/kg + 20.0 mg/kg перорално) върху имунната реактивност на плъхове, подложени на модел на хроничен стрес за 4 седмици, последвано и от предизвикване на системно възпаление с липополизахарид. Флуоксетин (2.5 mg/kg перорално) 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.

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

Abstarct:

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 predisposing 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 multicomponent 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:

Различни групи фактори като генетични фенотипове, невроендокринни нарушения, прилагането на някои лекарства, поведенчески, социални и екологични фактори, водят до повишено натрупване на тегло и затлъстяване. Прогресивно нарастващите нива на наднормено тегло и затлъстяване в световен мащаб доведоха до въвеждането на нов термин „епидемия от затлъстяване“. Прекомерното натрупване на телесни мазнини и особено на висцералната мастна тъкан е основния предразполагащ фактор за развитието на метаболитен синдром и други съпътстващи заболявания, свързани със затлъстяването. Понастоящем само няколко фармакотерапевтични средства се използват за дългосрочно лечение на затлъстяване, със специфично действие, напр. инхибитори на панкреатичната

и стомашната липаза, действащи като адреномиметици или активиращи центровете на ситост в хипоталамуса. Лекарствата на растителна основа, които ускоряват загубата на тегло, са безопасни, ефективни и широко достъпни и биха били предпочитана алтернатива за лечение на затлъстяване. Тъй като растителните екстракти са многокомпонентни системи, те също така могат да действат по повече от един механизъм, включително намалена липидна абсорбция, намален енергиен прием, увеличени енергийни разходи, намалена диференциация и пролиферация при адипоцитите, намалена липогенеза и повишена липолиза.

Настоящият обзор представлява обобщение на рисковите фактори свързани с развитието на затлъстяването и характеристика на последиците от него. Представени са настоящи възможности за лечение, съчетаващи промени в начина на живот и конвенционално лечение с търговски препарати против затлъстяване. Акцентирано е върху *in vitro* и *in vivo* изследвания върху хора, на потенциални лечебни растителни екстракти и фитопрепарати, като полифеноли, терпеноиди, алкалоиди, сапонини, способни да модулират молекулярните пътища и експресиите на гени/протеини, свързани със затлъстяването.

17. Hidalgo D., Georgiev M., **Marchev A.**, Bru-Martínez R., Cusidó R., Corchete P., Palazon J.* (2017) Tailoring tobacco hairy root metabolism for the production of stilbenes. *Scientific Reports*, 7: 17976 (**ИФ**₂₀₁₇ **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 $\mu\text{g L}^{-1}$ of *t*-R, which was partially metabolized into *t*-Pn and *t*-Pt (up to 2.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 86.4 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively), as well as its glucoside piceid (up to 339.7 $\mu\text{g L}^{-1}$). 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*-пикеатанол 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). Получените резултати разкриват устойчивостта на генетично модифицираните трансформирани коренови системи относно хетероложната продукция на *t*-ресвератрол и неговите деривати, като *t*-пицеатанол и *t*-птеростилбен. Стимулирането на фенолния метаболизъм, чието отражение се забелязва в повишените нива на кафеена и синапова киселина в трансформирани коренови култури, носещи AtMYB12 транскрипционния фактор, могат да осигурят предшественици и за конкурентните пътища, водещи до синтеза на лигнан и лигнин. В тази връзка е необходимо използването на нови подходи, в които конкурентните пътища се блокират от специфични микроРНК-и, а потока на въглерода се канализира ефективно към биосинтеза на стилбени. 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.

18. Marchev A., Dimitrova P., Burns A., Kostov R., Dinkova-Kostova A., Georgiev M.* (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 (ИФ₂₀₁₇ 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 дегенеративно заболяване на ставите, свързано с болка, увреждане и тяхната деформация. Болестта започва с увреждане на хрущяла, но след това прогресивно обхваща субхондралната кост, причинявайки дисбаланс между остеокластната костна резорбция и остеобластното ремоделиране. Тук обобщаваме данните за ролята на оксидативния стрес и възпалението в патологията на ОА и как тези два процеса са интегрирани по време на прогресията на ОА, както и техния принос към аномалии в хрущялния/костния метаболизъм. На клетъчно ниво, върху оксидативния стрес и възпалението може да се противодейства чрез транскрипционен фактор ядрен фактор еритроид р45-свързан фактор 2 (NRF2) и ние описваме регулацията на NRF2, подчертавайки неговата роля в патологията на ОА, както и полезния ефект на някои фитонутриенти, включително техния терапевтичен потенциал при активиране на NRF2 в ОА.

19. **Marchev A.***, Dimitrova P., Koycheva I., Georgiev M. (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 (ИФ₂₀₁₇ 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 или 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 скрининг за оценка на клетъчната жизненост на Jurkat Т-клетки показва, че основните молекули идентифицирани в екстракта от коренища на *R. rosea* дозозависимо повишават апоптозата, като с най-силна активност са розавин и розарин. Салидрозид и розин повлияват ранните прояви на Т-клетъчно активиране с промяна в 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 повишава 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 аутоимунни и ракови заболявания.

20. **Marchev A.***, Aveva I., Koycheva I., Georgiev M. (2017) Phytochemical variations of *Rhodiola rosea* L. wild-grown in Bulgaria. *Phytochemistry Letters*, 20: 386-390 (ИФ₂₀₁₇ 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 и интензивно приложение 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%. Тези количества на салидрозид и розавин са достатъчно високи, за да изпълнят критериите за тяхното съдържание в *R. rosea* сагласно фармакопейните изисквания на Русия (0.8–1% салидрозид и 3% розавин) и САЩ (0.08% салидрозид и 0.3% розавин). Поради тази причина се очаква, че изследваните тук екстракти от златен корен ще притежават и добра биологична активност.

21. Vasileva L.*, Getova D., Doncheva N., **Marchev A.**, Georgiev M. (2016) Beneficial effect of commercial *Rhodiola* extract in rats with scopolamine-induced memory impairment on active avoidance. *Journal of Ethnopharmacology*, 193: 586-591 (**ИФ₂₀₁₆ 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) познат още 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 тези 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 разкриват 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.

22. Marchev A., Yordanova Z., Alipieva K., Zahmanov G., Rusinova-Videva S., Kapchina-Toteva V., Simova S., Popova M., Georgiev M.* (2016) Genetic transformation of rare *Verbascum eriophorum* Godr. plants and metabolic alterations revealed by NMR-based metabolomics. *Biotechnology Letters*, 38: 1621-1629 (ИФ₂₀₁₆ 1.730; Q3).

Abstract:

Objectives To develop a protocol to transform *Verbascum eriophorum* and to study the metabolic differences between mother plants and hairy root culture by applying NMR and processing the datasets with chemometric tools.

Results *Verbascum eriophorum* is a rare species with restricted distribution, which is poorly studied. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation of *V. eriophorum* and hairy root culture induction are reported for the first time. To determine metabolic alterations, *V. eriophorum* mother plants and relevant hairy root culture were subjected to comprehensive metabolomic analyses, using NMR (1D and 2D). Metabolomics data, processed using chemometric tools (and principal component analysis in particular) allowed exploration of *V. eriophorum* metabolome and have enabled identification of verbascoside (by means of 2D-TOCSY NMR) as the most abundant compound in hairy root culture.

Conclusion Metabolomics data contribute to the elucidation of metabolic alterations after T-DNA transfer to the host *V. eriophorum* genome and the development of hairy root culture for sustainable bioproduction of high value verbascoside.

Резюме:

Целта на изследването е да се разработи протокол за генетична трансформация на *Verbascum eriophorum* и изследване на метаболитните разлики между майчиното растение и получените с *Agrobacterium rhizogenes* трансформирани коренови култури

чрез прилагане на ЯМР-метаболично профилиране. *Verbascum eriophorum* е рядък вид с ограничено разпространение и е слабо проучен по отношение на фитохимичен състав. В това изследване за пръв път е проведена генетична трансформация на *V. eriophorum* с цел определяне на метаболични промени в трансформираните коренови култури спрямо майчиното растение посредством 1Д- и 2Д ЯМР-базирана метаболомика. В резултат на това е идентифицирана структурата на вербаскозида, който е и мажорния метаболит в трансформираните корени. Тези данни свидетелстват за приложението на метаболомиката с цел изясняване на метаболичните изменения след трансфера на Т-ДНК от *A. rhizogenes* в генома на *V. eriophorum*, както и възможността за използване на получените корени като биотехнологична платформа за устойчиво продуциране на ценни вторични метаболити от растителен произход.

23. Marchev A.*, Dinkova-Kostova A., György Z., Mirmazloun I., Aneva I., Georgiev M. (2016) *Rhodiola rosea* L.: from golden root to green cell factories. *Phytochemistry Reviews*, 15: 515-536 (ИФ₂₀₁₆ 3.393; Q1).

Abstract:

Rhodiola rosea L. is a worldwide popular plant with adaptogenic activities that have been and currently are exploited in the traditional medicine of many countries, as well as, examined in a number of clinical trials. More than 140 chemical structures have been identified which belong to several natural product classes, including phenylpropanoid glycosides, phenylethanoids, flavonoids and essential oils, and are mainly stored in the rhizomes and the roots of the plant. A number of mechanisms contribute to the adaptogenic activities of *R. rosea* preparations and its phytochemical constituents. Among them, the intrinsic inducible mammalian stress responses and their effector proteins, such as heat shock protein 70 (Hsp70), are the most prominent. Due to its popular medicinal use, which has led to depletion of its natural habitats, *R. rosea* is now considered as endangered in most parts of the world. Conservation, cultivation and micropropagation are all implemented as potential preservation strategies. A number of *in vitro* systems of *R. rosea* are being developed as sources of pharmaceutically valuable secondary metabolites. These are greatly facilitated by advances in elucidation of the biosynthetic pathways and the enzymes, which catalyse the production of these secondary metabolites in the plant. In addition, biotechnological approaches show promise towards achieving sustainable production of *R. rosea* secondary metabolites.

Резюме:

Rhodiola rosea L. има популярност в цял свят като растение с адаптогенно действие и се използва интензивно в традиционната и съвременната медицина в много страни. Идентифицирани са повече от 140 химически структури, които принадлежат към няколко химични класа съединения, включително фенилпропаноидни гликозиди, фенилетаноиди, флавоноиди и етерични масла, които се акумулират главно в коренищата и корените на растението. Съществуват множество механизми, които допринасят за адаптогенните свойства на *R. rosea*, както и съединенията, съдържащи се в нея. Сред тях един от най-активните компоненти е хийт-шок протеина (Hsp70). Поради популярната си медицинска употреба, това е довело до изчерпване на естествените местообитания на растението, и в наши дни *R. rosea* е застрашен вид в повечето части на света. Консервирането, култивирането и микроразмножаването се прилагат като потенциални стратегии за опазване на вида. Инициирани са редица *in vitro* системи от *R. rosea* като източници на фармацевтично ценни вторични метаболити. Голямо тяхно предимство е възможността за изучаване на биосинтетичните пътища и ензимите, които

катализират синтеза на тези вторични метаболити и съответно води до тяхната повишена продукция.

24. Georgiev M.*, Radziszewska A., Neumann M., **Marchev A.**, Alipieva K., Ludwig-Müller J. (2015) Metabolic alterations of *Verbascum nigrum* L. plants and SAARt transformed roots as revealed by NMR-based metabolomics. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 123(2): 349-356 (**ИФ₂₀₁₅ 2.390; Q1**).

Abstract:

Verbascum nigrum L. (dark mullein) is known to be a rich source of bioactive secondary metabolites, including high value iridoid and phenylethanoid glycosides, hence the development of alternative approaches for their sustainable supply is highly relevant. Here we report the induction of a transformed root culture of *V. nigrum* by applying sonication assisted *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation. Further, nuclear magnetic resonance (NMR)-based metabolomics approach has been successfully applied to study metabolic differences of the *V. nigrum* mother plant and related transformed roots. ¹H NMR fingerprinting in combination with 2D NMR and multivariate data analysis revealed that the most abundant molecule in the hairy root culture is glutamine, which is not found in the mother plant tissue. These findings provide important insights on the metabolic alterations as a result of the transformation of the host plant genome and development of so-called hairy roots.

Резюме:

Verbascum nigrum L. (тъмен лопен) е богат източник на биологично активни вторични метаболити, включително иридоидни и фенилетаноидни гликозиди с висока фармакологична стойност, следователно развитието на алтернативни подходи за тяхната устойчива продукция е от голямо значение. В това проучване се съобщава за индуцирането на трансформирана коренова култура чрез генетична трансформация с *Agrobacterium rhizogenes* на растението *V. nigrum*, чрез третиране на растителните експлантите с ултразвук. Наред с това успешно е приложена и ЯМР-метаболомиката за определяне на метаболитните разлики между изходното растение *V. nigrum* и получените трансформирани коренови култури. Едно- и двумерен ЯМР-платформа в комбинация с мултивариативният анализ на показват, че в най-голямо количество е аминокиселината глутамин в трансформираните корени, което е и основната разлика в сравнение с майчиното растение. Тези констатации предоставят важни изводи за метаболитните промени в резултат на генетичната трансформация, при която става пренос на Т-ДНК от бактерията в растението гостоприемник, в резултат на което се получават т. нар. трансформирани корени.

25. Georgieva L., Ivanov I., **Marchev A.**, Aneva A., Denev P., Georgiev V., Pavlov A.* (2015) Protopine production by *Fumaria* cell suspension cultures: effect of light. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(1): 287-300 (**ИФ₂₀₁₅ 1.606; Q3**).

Abstract:

Protopine biosynthesis in *Fumaria rostellata* and *Fumaria officinalis* cell suspensions was investigated. For the first time, we reported for calli and cell suspensions obtained from *F. rostellata* and *F. officinalis*. Callus induction was initiated on a Murashige and Skoog medium, supplemented with sucrose and various concentrations of plant growth regulators: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 6-benzylaminopurine (BAP). The best morphological characteristics, growth behavior, and protopine biosynthesis were observed for two callus lines (5FRL14 and 12FOL1) cultivated under submerged conditions, at low concentration of 2,4-D

(0.2 and 0.5 mg/L) and higher concentration of BAP (2.0 and 3.0 mg/L). The maximal yield of protopine was accumulated from cell suspension of *F. rostellata* (line 5FRL14) cultivated under illumination-49.6 mg/L. Time courses of utilization of sucrose, ammonium, nitrate, and phosphate ions in cultural liquid and acetylcholinesterase inhibitory activity of alkaloid extracts of studied suspensions are also presented.

Резюме:

Изследван е биосинтеза на протопин в клетъчни суспензии на *Fumaria rostellata* и *Fumaria officinalis*, чието инициране се докладва също така и за пръв път. Индукцията на калус е иницирана на Murashige и Skoog хранителна среда с добавена захароза и различни концентрации на растежни регулатори, като 2.4-дихлорофеноксицетна киселина (2.4-D) и 6-бензиламинопурин (BAP). Най-добър растеж и биосинтез на протопин се наблюдава в две суспензионни линии (5FRL14 и 12FOL1), култивирани в течна среда, при ниска концентрация на 2.4-D (0.2 и 0.5 mg/L) и по-висока концентрация на BAP (2.0 и 3.0 mg/L). Максималният добив на протопин е отчетен в клетъчна суспензия на *F. rostellata* (линия 5FRL14), култивирана при фотопериод 16 h светло/8 h тъмно (49.6 mg/L). Изследвано е също така и усвояването на захароза, амониеви, нитратни и фосфатни йони в културална течност и ацетилхолинестераза инхибираща активност на алкалоидните екстракти от изследваните суспензии.

26. Georgiev V., **Marchev A.**, Nikolova M., Ivanov I., Gochev V., Stoyanova A.*, Pavlov A. (2013) Chemical composition of essential oils from leaves and flowers of *Salvia ringens* Sibth. et Sm. growing wild in Bulgaria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16(5): 624-629 (**ИФ**₂₀₁₃ **0.187**; **Q4**).

Abstract:

The constituents of essential oils, obtained from different aerial parts (leaves and flowers) of *Salvia ringens* Sibth. et Sm. growing wild in Bulgaria, have been analyzed by GC-MS. The yields of leaves and flowers oils were similar (0.03 % v/w and 0.04 % v/w). 60 compounds were identified in both oils, which correspond to 97.7 % and 97.3 % of the total oils constituents for leaves and flower oils, respectively. Both leaves and flowers oils showed similar chemical compositions, with predominance of camphor (17.2 % and 18.8 %) and borneol (7.2 % and 8.7 %). Further analyses of minor component distributions proves that the both leaves and flowers could be equally used as a raw material for obtaining of camphor reach essential oil from *Salvia ringens* Sibth. et Sm.

Резюме:

Анализиран е състава на етеричното масло, получено от различни въздушни части (листа и цветове) на *Salvia ringens* Sibth. et Sm., диворастваща в България чрез ГХ/МС. Добивът на етерично масло от листата и цветовете е сходен (0.03% v/w и 0.04% v/w). Идентифицирани са 60 компонента в състава на двете масла, които представляват 97.7% и 97.3% от общия състав на етеричното масло. Като основни компоненти са идентифицирани камфор (17.2% и 18.8%) и борнеол (7.2% и 8.7%). Анализа и на минорните компоненти в състава на маслото от листа и цветове, показва, че те могат да бъдат равностойно използвани за получаването на етерични масла от *S. Ringens*, богати на камфор.

27. Steingroewer J.*, Bley Th., Georgiev V., Ivanov I., Lenk F., **Marchev A.**, Pavlov A. (2013) Bioprocessing of differentiated plant *in vitro* systems. *Engineering in Life Sciences*, 13(1): 26-38 (**ИФ**₂₀₁₃ **1.890**; **Q3**).

Abstract:

Plant cells contain a wide range of interesting secondary metabolites, which are used as natural pigments and flavoring agents in foods and cosmetics as well as phytopharmaceutical products. However, conventional industrial extraction from whole plants or parts of them is limited due to environmental and geographical issues. The production of secondary metabolites from *in vitro* cultures can be considered as alternative to classical technologies and allows a year-round cultivation in the bioreactor under optimal conditions with constant high-level quality and quantity. Compared to plant cell suspensions, differentiated plant *in vitro* systems offer the advantage that they are genetically stable. Moreover, the separation of the biomass from culture medium after fermentation is much easier. Nevertheless, several investigations in the literature described that differentiated plant *in vitro* systems are instable concerning the yield of the target metabolites, especially in submerged cultivations. Other major problems are associated with the challenges of cultivation conditions and bioreactor design as well as upscaling of the process. This article reviews bioreactor designs for cultivation of differentiated plant *in vitro* systems, secondary metabolite production in different bioreactor systems as well as aspects of process control, management, and modeling and gives perspectives for future cultivation methods.

Резюме:

Растителната клетка съдържа голям брой вторични метаболити, които се използват като натурални пигменти, овкусители в хранителната и козметичната индустрия, както и като фитофармацевтични продукти. Конвенционалната екстракция на растения от природата е свързана с някои природни и географски ограничения. Биосинтеза на вторични метаболити от растителни *in vitro* системи е подходяща алтернатива на класическите технологии и позволява култивиране през цялата година в биореакторни системи при оптимални условия с възможност за получаване на метаболити с висок добив и качество. В сравнение с растителните клетъчни суспензии, диференцираните растителни системи имат някои предимства, като генетична стабилност например. Въпреки това, някои недостатъци на диференцираните култури в повечето случаи е, че имат нисък добив на целеви метаболити, дължащи се на техните морфологични характеристики по време на биореакторното култивиране, което възпрепятства и мащабирането на процеса. Тук е направено обобщение на различните видове дизайн на биореактори за култивиране на диференцирани *in vitro* системи, биосинтеза на вторични метаболити от тях, а също така и някои аспекти свързани с контрола, управлението и моделирането на култивационните процеси.

28. Marchev A., Ivanov I., Vrancheva R., Pavlov A.* (2013) Solid phase extraction and HPLC determination of phloridzin in natural products. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 19(2): 201-203.

Abstract:

A reliable technique for routine analysis of phloridzin from natural products (apples and plums) combining solid phase extraction with Amberlite XAD4 and subsequent HPLC analysis was developed. The proposed methodology is less complex than other methods for flavonoid analysis from natural samples. The samples were extracted with acidified water (pH2) and then adsorption on resin XAD4 was carried out. The highest recovery value of 90% was achieved when methanol was applied as eluent. With the developed HPLC method the analysis were performed for 20 min using Waters HPLC system with UV detection at 285 nm and Supelco Discovery HS C18 column (5 μ m, 25 cm \times 4.6 mm) operated at 26°C. The mobile phase

consisted of solvent A: 2% acetic acid and solvent B: acetonitrile under gradient flow rate. Under these operating conditions the method was precise, linear relationship was established in the range of 10-100 µg/mL, and the coefficient of correlation (r^2) was > 0.99 . This technique was applied for the analysis of phloridzin in different samples of *Malus* “Golden delicious” and *Prunus* “Trojan blue”. The content of phloridzin in the different samples ranged between 14.0 and 24.0 µg/g of fruits.

Резюме:

Разработена е надеждна техника за рутинно определяне на флоридзин от природни продукти (ябълки и сливи), комбинирайки твърдофазова екстракция с Amberlite XAD4 и ВЕТХ анализ. Пробите се екстрахират с вода с рН2 и след това се абсортират на смола XAD4. Най-високият добив на флоридзин от 90% е постигнат при използването на метанол като елуент. Разработеният ВЕТХ метод е изпълним за 20 мин, използвайки Waters HPLC система с UV детекция при 285 nm, колона Supelco Discovery HS C18 (5 µm, 25 cm × 4.6 mm), работеща при 26°C. Подвижната фаза се състои от разтворител А: 2% оцетна киселина и разтворител В: ацетонитрил, използвайки градиентен поток. При тези условия линейността на стандартната права е в стойностите 10-100 µg/mL, а коефициента на корелация (r^2) е > 0.99 . Тази техника е приложена за анализ на флоридзин в различни проби *Malus* “Златна превъзходна” и *Prunus* “Троянска синя”. Съдържанието на флоридзин в различните проби варира от 14.0 до 24.0 µg/g на плодове.

29. Marchev A., Georgiev V., Ivanov I., Pavlov A.* (2012) Cultivation of diploid and tetraploid hairy Roots of *Datura stramonium* L. in stirred tank bioreactor for tropane alkaloid production. *Journal of Bioscience and Biotechnology*, 1(3): 211-216.

Abstract:

Biomass accumulation and tropane alkaloids production by diploid and tetraploid hairy root cultures of *Datura stramonium* L. cultivated in stirred tank bioreactor at different aeration rates were investigated. The maximal growth for both hairy root cultures (ADB = 8.3 g/L and 6.8 g/L for diploid and tetraploid line, respectively) was achieved at aeration rate of 15.0 L/(L.h). The corresponding growth indexes were remarkably high (GIDW = 9.0 and 7.8 for diploid and tetraploid line, respectively) compared to the values, usually reported for other hairy root cultures. The optimal aeration rate for biomass accumulation was also optimal for alkaloids biosynthesis. According to our survey, the achieved maximal amounts of accumulated hyoscyamine (35.0 mg/L and 27.0 mg/L for diploid and tetraploid line) were the highest reported in the scientific literature for *D. stramonium* L. hairy roots. During the cultivation in stirred tank bioreactor, the hairy roots biosynthesized pharmaceutically important alkaloid scopolamine in minor concentrations. This is an important observation since scopolamine was not detected during submerged cultivation of these hairy root lines in other bioreactor types. However, the ploidy level was found to be the most important factor concerning scopolamine production by *D. stramonium* L. hairy roots cultures. The present work demonstrated the effect of ploidy levels on biomass accumulation and tropane alkaloids production by *D. stramonium* L. hairy roots cultivated in stirred tank bioreactor. This investigation shows that the stirred tank bioreactor could be successfully applied for both maximal biomass accumulations, as well as for manipulation of tropane alkaloids production by diploid and tetraploid *D. stramonium* L. hairy root cultures.

Резюме:

Изследвано е акумулирането на биомаса и биосинтез на тропанови алкалоиди от диплоидни и тетраплоидни коренови култури на *Datura stramonium* L., култивирани в

биореактор с механично разбъркване при различна скорост на аериране. Максималния растеж на двете коренови култури (ADB = 8.3 g/L и 6.8 g/L) е постигнато при скорост на аериране от 15.0 L/(L.h). Съответните растежни индекси (GIDW = 9.0 и 7.8) са високи в сравнение с други такива коренови култури. Оптималната скорост на аериране за акумулиране на биомаса е оптимална и за биосинтез на алкалоиди. Докладваните тук стойности на хиосциамин (35.0 mg/L и 27.0 mg/L) са най-високите докладвани до сега в научната литература по отношение на трансформирани корени от *D. stramonium* L. Изследваните коренови линии синтезират също така и скополамин в малки количества. Това е важно наблюдение, тъй като скополамин не се синтезира при култивиране в други видове биореакторни системи. Въпреки това, пloidното ниво е най-важният фактор за биосинтеза на скополамин в трансформирани корени на *D. stramonium* L. Текущото изследване разкрива ефекта на пloidното ниво върху биосинтеза на тропанови алкалоиди от коренови култури на *D. stramonium* L. в биореактор с механично разбъркване. Този тип биореакторна конструкция може да се използва успешно за максимален добив на алкалоиди от диплоидни и тетраплоидни коренови култури от *D. stramonium* L.

30. Vrancheva R., Ivanov I.*, **Marchev A.**, Pavlov A. (2012) Qualitative and quantitative determination of protopine in *Fumaria* spp. by TLC-densitometry method. *Journal of Bioscience and Biotechnology*, 1(3): 255-259.

Abstract:

A rapid and accurate TLC-densitometry method for qualitative and quantitative determination of protopine has been developed. The best separation was achieved using a mobile phase chloroform – ethyl acetate – methanol – ammonium hydroxide (80:80:40:0.05, v/v/v/v). The results obtained by this method (CV% 3.4) corresponded well with those obtained by using a HPLC method. The reliability of the proposed method was proved through reproducibility test with alkaloid extracts from *Fumaria* spp.

Резюме:

Разработен е прецизен TLC-денситометричен метод за качествено и количествено определяне на протопин. Най-доброто разделяне е постигнато при използването на подвижна фаза хлороформ – етил ацетат – метанол – амониев хидроксид (80:80:40:0.05, v/v/v/v). Получените резултати (CV% 3.4) кореспондират добре с тези получени от ВЕТХ анализи. Надежността на метода е потвърдена чрез тест за възпроизводимост с алкалоидна екстракция от растения от род *Fumaria* spp.

31. **Marchev A.***, Georgiev V., Badjakov I., Kondakova V., Nikolova M., Pavlov A. (2011) Triterpenes production by rhizogenic callus of *Salvia scabiosifolia* obtained via *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25(5): 1-4.

Abstract:

Rhizogenic callus of *Salvia scabiosifolia* Lam. formed after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 was isolated and investigated for triterpenes production. The rhizogenic callus was cultivated on MS medium free of phytohormones and showed stable morphological and growth characteristic. The genetic transformation was confirmed by PCR amplification of rolA gene, found in the genome of transformed rhizogenic callus cells. Cell suspension was successfully initiated by transferring rhizogenic callus on LS medium supplied with 0.2 mg/L 2,4-D. The suspension culture was stable, fast growing (accumulated 1.709 g dry

biomass/L) and produced 829.14 $\mu\text{g/g}$ dry biomass oleanolic acid. This is the first report for initiation of rhizogenic cell suspension culture from the rare plant *Salvia scabiosifolia* Lam.

Резюме:

Получен е ризогенен калус от *Salvia scabiosifolia* Lam. след генетична трансформация с *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834, който е изследван за биосинтез на тритерпени. Ризогенният калус е култивиран на MS хранителна среда без растежни регулатори и показва стабилни растежни и биосинтетични характеристики. Генетичната трансформация е потвърдена чрез PCR амплификация на rolA гена, който се намира в генома на трансформирания ризогенен калус. Инициирана е клетъчна суспензия чрез трансфер на ризогенния калус върху LS среда с добавени 0.2 mg/L 2.4-D. Супензионната култура има също добри растежни характеристики (акумулира 1.709 g суха биомаса/L) и продуцира 829.14 $\mu\text{g/g}$ суха биомаса олеанолова киселина. Това е първия доклад за иницииране на ризогенна клетъчна суспензия от редкия и застрашен растителен вид *Salvia scabiosifolia* Lam.

32. Pavlov A., Georgiev V.*, **Marchev A.**, Berkov S. (2009) Nutrient medium optimization for hyoscyamine production in diploid and tetraploid *Datura stramonium* L. hairy root cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25:2239-2245 (**ИФ**₂₀₀₉ **1.278; Q2**).

Abstract:

The common effect of NO_3^- , KH_2PO_4 and sucrose on the biosynthesis of hyoscyamine by diploid and tetraploid *Datura stramonium* L. hairy root cultures were studied. Polynomial regression models were elaborated for the description of hyoscyamine biosynthesis as a consequence of variation of the investigated variables (NO_3^- between 31 and 47 mM, and sucrose between 20.00 and 40.00 g/l for diploid and NO_3^- between 31 and 47 mM; KH_2PO_4 between 0.50 and 1.25 mM, and sucrose between 50 and 70 g/l, for tetraploid hairy roots, respectively). Optimization procedures allowed us to establish the optimal concentrations of the investigated variables and to propose the modified MS nutrient media, with 1.10 g/l KNO_3 , 0.17 g/l KH_2PO_4 , and 40 g/l sucrose, for diploid and with 1.10 g/l KNO_3 , 0.17 g/l KH_2PO_4 , and 50 g/l sucrose, for tetraploid *Datura stramonium* L. hairy root cultures. The proposed modified MS media provided optimal hyoscyamine production yield for both investigated hairy root cultures.

Резюме:

Изследван е ефекта на NO_3^- , KH_2PO_4 и захароза върху биосинтеза на хиосциамин от диплоидни и тетраплоидни трансформирани коренови линии на *Datura stramonium* L. Получените регресионни зависимости, описват биосинтеза на хиосциамин като резултат от вариациите на изследваните променливи (NO_3^- между 31 и 47 mM, и захароза между 20.00 и 40.00 g/l за диплоидните и NO_3^- между 31 и 47 mM; KH_2PO_4 между 0.50 и 1.25 mM, и захароза между 50 и 70 g/l, за тетраплоидните корени съответно). Тази процедура на оптимизация на състава на хранителната среда води до установяване на оптималните концентрации от изследваните хранителни компоненти и позволява да се предложи модифициран състав на MS хранителната среда с 1.10 g/l KNO_3 , 0.17 g/l KH_2PO_4 , и 40 g/l захароза, за диплоидните и 1.10 g/l KNO_3 , 0.17 g/l KH_2PO_4 , и 50 g/l захароза, за тетраплоидните коренови култури. Предложеният състав на хранителната среда води до оптималната продукция на хиосциамин в двете изследвани линии.

- 33. Marchev A.***, Georgiev V., Pavlov A. (2017) Development of plant *in vitro* systems from the genus *Salvia* towards biosynthesis of biologically active triterpenes. *Microbiology for Better Health and Future*, 70th Anniversary of The Stephan Angeloff Institute of Microbiology: 177-184.

Abstract:

Plants from the genus *Salvia* are abundant natural source of triterpenes. Triterpenes exhibit numerous valuable biological activities, e.g. anti-inflammatory, cytotoxic, antiviral and antimicrobial, which makes them attractive for pharmaceutical and cosmetics industry. The latest scientific discoveries reveal the potent hepatoprotective, antitumor, anti-inflammatory and antireumatic activities of ursolic and oleanolic acid, which provokes the interest of many pharmaceutical companies to incorporate them in many drugs. As a result of the growing market demand raises the necessity from the development of alternative technologies for triterpenes production. The induction and utilization of plant cell suspension cultures and hairy roots from species of the genus *Salvia* might be an appropriate platform for their sustainable biosynthesis. Currently we summarize the latest investigations from a working group in the Laboratory of Applied Biotechnologies in Plovdiv, which is focused on induction and assessment of the biosynthetic potential of diverse plant *in vitro* systems from rare Bulgarian *Salvia* species and establishment of biotechnological process for biosynthesis of biologically active triterpenes.

Резюме:

Растенията от род *Salvia* са едни от най-богатите източници на тритерпени в природата. Тритерпените притежават важни биологични активности като: противовъзпалително, антивирусно, антимикробно и цитотоксично действие, което ги прави интересни молекули за фармацевтичната и козметична индустрия. Изследванията разкриват хепатопротективната, антираковата, антивъзпалителната и антиревматичната активности на урсоловата и олеаноловата киселини, което провокира интереса на големи фармацевтични компании към използване на тези субстанции в лекарствени продукти. Като следствие от повишения пазарен интерес възниква нужда от разработването на алтернативни технологии за получаването на тези биологично-активни вещества. Иницирането и използването на клетъчни суспензии и трансформирани коренови култури от растения от род *Salvia* може да се окаже подходяща алтернатива за получаването на биологично активни съединения принадлежащи към групата на тритерпените. В настоящата работа са обобщени последните резултатите на екипа от Лаборатория по приложни биотехнологии – Пловдив по получаване и охарактеризиране на биосинтетичния потенциал на различни растителни *in vitro* системи от редки за България представители на род *Salvia* и разработването на биотехнологичен процес за получаване на биологично-активни тритерпени от тях.

- 34. Georgieva L., Ivanov I., Marchev A., Aneva I., Georgiev V., Denev P., Pavlov A.*** (2015) Initiation and selection of callus cultures from *Fumaria rostellata* Knaf. as potential producers of isoquinoline alkaloids. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, Vol. XIX: 52-57.

Abstract:

The aim of the study was development of protocols for obtaining callus cultures from *Fumaria rostellata* Knaf. For the purpose leaves, stems and flowers of the investigated plant were used as explants. Callus was initiated on a Murashige and Skoog nutrient medium, supplemented

with 30 g/l sucrose, 5.5 g/l “Plant” agar and various concentrations (0.2; 0.5; 1.0; 2.0; 3.0 mg/l) of auxin (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and cytokine (6-benzylaminopurine). The best results for initiation of calli were observed at a low concentration of 2,4-D (0.2 mg/l or 0.5 mg/l) and a high concentration of BAP (2.0 mg/l or 3.0 mg/l). It is well known that *Fumaria* plants are rich sources of isoquinoline alkaloids and obtained *in vitro* cultures from *F. rostellata* could be used as potential technological matrixes for development of a commercial process for protopine production.

Резюме:

Целта на изследването е разработване на протокол за получаване на калусни култури от *Fumaria rostellata* Knaf. За експлант са използвани листа, стъбла и цветове на изследваното растение. Калусът е инициран на Murashige и Skoog хранителна среда, допълнена с 30 g/L захароза, 5.5 g/L растителен агар и различни концентрации (0.2; 0.5; 1.0; 2.0 и 3.0 mg/L) ауксин (2.4-дихлорофеноксиоцетна киселина) и цитокин (6-бензиламинопурин). Най-добри резултати за инициране на калус се наблюдават при ниска концентрация на 2.4-D (0.2 mg/L или 0.5 mg/L) и висока концентрация на BAP (2.0 mg/L или 3.0 mg/L). Добре известно е, че растенията от род *Fumaria* са богати източници на изохинолинови алкалоиди, следователно *in vitro* културите от *F. rostellata* могат да се използват като потенциална биотехнологични матрица за разработване на процес за биосинтез на протопин.

35. Raynova Y., **Marchev A.**, Doumanova L., Pavlov A., Idakieva K.* (2015) Antioxidant activity of *Helix aspersa maxima* (Gastropod) hemocyanin. *Acta Microbiologica Bulgarica*, 31(2): 127-131.

Abstract:

Hemocyanins (Hcs) are oligomeric copper-containing proteins that function as oxygen carriers in the hemolymph of several mollusks and arthropods. In this study we present an investigation on the antioxidant activity of the Hc isolated from snails *Helix aspersa maxima* (HaH), using various experimental models. The free radical scavenging activity was determined against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical and [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] free radical cation (ABTS). Cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC) and Ferric-reducing antioxidant power (FRAP) assay also were carried out. The results obtained show that HaH exhibits good radical scavenging activity by 59.54% reduction of the DPPH and 62.31% inhibition of ABTS radicals. Furthermore, HaH demonstrated a strong chelating effect on copper ions measured through CUPRAC method.

In conclusion, the present study revealed for the first time the antioxidant properties of molluscan Hc. The antioxidative activity of HaH could probably involve quenching of reactive oxygen species and metal ion chelation, thereby reducing the potential of prooxidants to attack cellular components.

Резюме:

Хемоцианините са олигомерни мед-съдържащи протеини, които функционират като кислородни носители в хемолимфата на повечето мекотели и ракообразни организми. Представено е изследване на антиоксидантната активност на хемоцианин, изолиран от охлюви *Helix aspersa maxima* (HaH), използвайки различни експериментални модели. Радикал улавящата активност на хемоцианина е определена спрямо свободните радикали 1.1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) и [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] (ABTS). Антиоксидантната активност на хемоцианина е анализирана и с методите CUPRAC и FRAP, които отчитат степента на електронен трансфер на антиоксиданта към

радикала. Получените резултати показват, че НaН притежава добра радикал улавяща активност, изразена в 59.54% редуциране на DPPH и 62.31% инхибиране на ABTS радикалите. Освен това, анализите с CUPRAC метода демонстрират, че НaН притежава силна способност да хелатира медни йони.

В заключение, настоящото изследване демонстрира за първи път антиоксидантните свойства на хемоцианин. Вероятно, антиоксидантната активност на НaН включва, както улавяне на реактивни форми на кислорода, така и хелатиране на метални йони, като по този начин намалява потенциала на прооксидантите да атакуват компонентите на клетката.

36. Teneva Ts., Beshkova D.*, **Marchev A.**, Nikolova M., Frengova G., Pavlov A. (2014) *Geranium sanguineum* L. - an alternative source for isolation of lactic acid bacteria. *Ecological Engineering and Environment Protection*, 1: 4-11.

Abstract:

In recent years it was observed a trend for increased interest in lactic acid bacteria (LAB), isolated from nondairy environment due to their diverse metabolic profile and unique flavor-forming activities. Looking for new solutions to improve starter systems for healthy fermented foods and to expand opportunities for maximum utilization of biological potential of LAB, results in the idea of exploiting biodiversity of the unique natural bio-systems (medicinal plants). After large-scale screening of 300 microbial isolates (obtained from different parts of *Geranium sanguineum* L.) based on coagulation of milk, gas formation and non-specific odour and succeeding multiple transfer and growth in MRS and M17 selective media were isolated 169 single bacterial colonies. By differentiating tests were selected 62 Gram (+) and catalase (-) LAB. Of the representative lactic acid flora of *G. sanguineum* L. was studied acid-producing activity.

Резюме:

В последните години се наблюдава нарастваща тенденция към изолирането на млечнокисели бактерии (LAB) от немлечна среда, поради техния разнообразен метаболитен профил и уникални вкусово-формиращи свойства. В търсенето на иновативни решения за подобряване на стартерните култури с цел получаване на здравословни ферментирани храни е изследвано биоразнообразието по отношение на млечнокисели бактерии от някои природни биосистеми (медицински растения). След скриниране на 300 микробни изолата (получени от различни части на *Geranium sanguineum* L.), базирано на коагулирането на мляко, формиране на газ, неспецифичен аромат и неколкократно култивиране на селективни MRS и M17 хранителни среди са изолирани 169 единични бактериални колонии. От тях са селектирани 62 Грам (+) и каталаза (-) LAB.

37. Ivanov I.*, Vrancheva R., **Marchev A.**, Petkova N., Aneva I., Denev P., Georgiev V., Pavlov A. (2014) Antioxidant activities and phenolic compounds in Bulgarian *Fumaria* species. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(2): 296-306.

Abstract:

Fumaria plants have been traditionally used against skin diseases, as diuretics, laxatives, hepatoprotectants and etc. Their biological activity is associated with the presence of isoquinoline alkaloids, while polyphenols are not investigated well in this context. Polyphenols could increase the added value of medicinal plants extracts by enhancing their antioxidant

activity or improving overall biological activities. The presented study evaluated the polyphenolic contents and antioxidant activities of extracts of five Bulgarian *Fumaria* species (*Fumariaceae*): *Fumaria officinalis* L., *Fumaria thuretii* Boiss., *Fumaria kralikii* Jord., *Fumaria rostellata* Knaf. and *Fumaria schrammii* (Asch) Velen. Qualitative and quantitative determinations of phenolic acids and flavonoids were performed by HPLC system with UV-detection. Antioxidant activity of extracts was evaluated by four popular spectrophotometric methods (DPPH, ABTS, FRAP and CUPRAC). The total phenolic content was the highest in extract of *F. officinalis* with quercetin (0.49 ± 0.03 mg/g DW), *p*-coumaric (1.10 ± 0.03 mg/g DW) and ferulic (2.35 ± 0.04 mg/g DW) acids as major compounds. This extract also showed the highest antioxidant activity among the investigated plants. Our data reveal new possibilities to expand applications of *Fumaria* extracts from a local ethnomedicine drug to new industrial fields such as foods and cosmetics preservation.

Резюме:

Растенията от род *Fumaria* се използват традиционно при кожни заболявания, като диуретици, хепатопротектанти и др. Тяхната биологична активност е свързана с присъствието на изохинолинови алкалоиди, докато съдържанието на фенолни съединения не е добре изследвано. Полифенолите може да повишат медицинската стойност на тези растения, дължащо се на повишената антиоксидантна активност конкретно или повишаване на биологичната активност като цяло. Изследвано е полифенолното съдържание и антиоксидантната активност на пет български видове *Fumaria* (семейство *Fumariaceae*): *Fumaria officinalis* L., *Fumaria thuretii* Boiss., *Fumaria kralikii* Jord., *Fumaria rostellata* Knaf. и *Fumaria schrammii* (Asch) Velen. Качественото и количественото определяне на фенолните киселини и флавоноидите е извършено посредством ВЕТХ система с UV-детекция. Антиоксидантната активност е изследвана по няколко спектрофотометрични метода (DPPH, ABTS, FRAP и CUPRAC). Най-високото съдържание на общи феноли е в екстракта от *F. officinalis*, а мажорните компоненти са кверцетин (0.49 ± 0.03 mg/g DW), *p*-кумарова (1.10 ± 0.03 mg/g DW) и ферулова киселини (2.35 ± 0.04 mg/g DW). Този екстракт също така показва и най-висока антиоксидантна активност в сравнение с другите изследвани растения. Тези данни разкриват нови възможности за разширяване на приложимостта на екстракти от *Fumaria*, варирайки от етномедицина до приложение в хранителната и козметичната промишленост.

38. Georgieva L., **Marchev A.**, Bojinov B., Ganeva D., Pavlov A.* (2013) Improved HPLC method for determination of organic acids from Bulgarian sorts of tomatoes. *Scientific Works, University of Food Technologies*, Vol. LX: 626-631.

Abstract:

An improved HPLC method for quantitative determination of malic acid, ascorbic acid, citric acid and fumaric acid was developed. HPLC separation was achieved using a reversed phase C18 column Symmetry® with 6 mM H₃PO₄ as a mobile phase (flow rate 0.5-1.0 mL/min.). The calibration curves were linear from 0.01 to 0.25 mg/mL for ascorbic ($r^2 > 0.99$) and fumaric ($r^2 > 0.99$) acids and from 0.1 to 1.0 mg/mL for malic ($r^2 > 0.99$) and citric ($r^2 > 0.99$) acids. The reliability of the proposed system was proved through reproducibility test with extracts from different Bulgarian varieties of tomato.

Резюме:

Подобрен е ВЕТХ метод за количествено определяне на ябълчена, аскорбинова, лимонена и фумарова киселина. Разделянето на веществата е постигнато чрез използването на обратно фазова C18 колона Symmetry® с 6 mM H₃PO₄ като подвижна

фаза (скорост на потока 0.5-1.0 mL/min.). Калибрационната права има линеен характер от 0.01 до 0.25 mg/mL за аскорбинова ($r^2 > 0.99$) и фумарова киселини ($r^2 > 0.99$) и от 0.1 до 1.0 mg/mL за ябълчена ($r^2 > 0.99$) и лимонена киселини ($r^2 > 0.99$). Надежността на метода е определена чрез тест за възпроизводимост с екстракти от различни български видове домати.

39. Georgieva L., **Marchev A.**, Ivanov I., Daniela G., Bojinov B., Pavlov A.* (2013) Improved HPLC methods for determination of carotenoids and tocopherols in different varieties of tomatoes. *Scientific Works, University of Food Technologies*, Vol. LX: 632-637.

Abstract:

HPLC methods for determination of fat soluble vitamins and biological activities of carotenoids have been improved and adapted for application to different varieties of tomatoes. HPLC separation was achieved using a reversed phase C18 column Discovery[®] with gradient system with acetonitril : methanol (8:2) and MTBE (methyl tert-butyl ether) flow rate 1.0 mL/min for carotenoids (luteolin, lycopene and β -carotene), and column Symmetry[®] with isocratic solvent system methanol: water (98:2) for quantitative determination of α -, β - and δ - tocopherols. The calibration curves were linear from 10 to 500 μ g/mL ($r^2 > 0.99$) for tocopherols and from 5 to 50 μ g/mL ($r^2 > 0.99$) for carotenoids. The reliability of the proposed systems were proved through reproducibility test with different extracts from lyophilized tomatoes samples. Critical for the success of determination was adding to mobile phases and during the extraction procedure synthetic antioxidant BHT (butylhydroxytoluene, 227 μ mol).

Резюме:

Адаптиран е ВЕТХ метод за количествено определяне на мастно разтворими витамини, изолирани от домати. Разделянето на веществата е постигнато с обратно фазова C18 колона Discovery[®] с градиентно елуиране със смес от ацетонитрил : метанол (8:2) и МТВЕ (терт-бутил метил етер), скорост на потока 1.0 mL/min за каротеноиди (лутеолин, ликопен и β -каротен), и колона Symmetry[®] с изокритична система от разтворители метанол: вода (98:2) за количествено определяне на α -, β - и δ - токофероли. Калибрационните прави имат линеен характер от 10 до 500 μ g/mL ($r^2 > 0.99$) за токофероли и от 5 до 50 μ g/mL ($r^2 > 0.99$) за каротеноиди. Надежността на ВЕТХ методите е потвърдена чрез тестове за възпроизводимост с различни екстракти от лиофилизирани домати. От критично значение за определянето на тези вещества е добавянето, както в мобилните фази, така и по време на екстракцията на синтетичния антиоксидант ВНТ (бутил хидрокси толуен в крайна концентрация 227 μ mol).

40. Vrancheva R., **Marchev A.**, Ivanov I., Georgiev V., Pavlov A.* (2012) HPLC method for qualitative and quantitative analysis of mono- and disaccharides with refractive index detection. *IX-th Scientific – technical conference with international participation “Ecology and health’ 2012”*: 411-416.

Abstract:

Rapid and accurate high-performane liquid chromatography (HPLC) method with refractive index detection (RID) for qualitative and quantitative analysis of free mono- and disaccharides (fructose, glucose, galactosea sucrose and lactose) was developed. The method was precise and linear relationship was established in the range of 0.5-5.0 mg/ml for each sugar analyzed. The method was successfully applied to determine the sugars in nutrient media of different plant *in vitro* systems and dairy products.

Резюме:

Адаптиран е бърз и прецизен ВЕТХ метод с използването на RID-детектор за качествено и количествено определяне на моно- и дизахариди (фруктоза, глюкоза, галактоза, захароза и лактоза). Получените стандартни прави на съединенията имат линеен характер в концентрациите от 0.5 до 5.0 mg/ml. Методът е успешно приложен за определяне съдържанието на захари в хранителната среда, използвана за култивиране на различни растителни *in vitro* системи, както и на млечни продукти.

41. Marchev A., Petrova A., Nedelcheva D., Lazarova I., Trusheva B., Kostova N., Bankova V., Pavlov A.* (2011) GC/MS profiles and antioxidant activity of extracts from *Lavandula vera* MM and *Rosa damascena* Mill. cell suspension cultures. *Scientific works – University of Food Technologies*, Vol. LVIII (2): 183-188.

Abstract:

Antioxidant activities of acetone and methanol extracts of *Lavandula vera* MM and *Rosa damascena* Mill. cell suspension cultures were investigated. The acetone extract of *R. damascena* and the methanol extract of *L. vera* showed strongest antioxidant activities estimated by ABTS, DPPH, FRAP and CUPRAC methods. On the base on the performed GC/MS analyses we suggested that these activities were due to terpene compounds in *R. damascena*, and phenolic compounds in *L. vera* extracts.

Резюме:

Изследвана е антиоксидантната активност на ацетонови и метанолни екстракти от клетъчна суспензия на *Lavandula vera* MM и *Rosa damascena* Mill. Установено е, че ацетоновия екстракт от *R. damascena* и метанолния екстракт от *L. vera* притежават най-силни антиоксидантни активности определени по ABTS, DPPH, FRAP и CUPRAC методите. Резултатите от проведените ГХ/МС анализи на получените екстракти предполагат, че тези активности се дължат на наличието на терпени в екстракта от *R. damascena* и фенолни съединения в екстракта от *L. vera*.

42. Marchev A., Nikolova M., Georgiev V.* (2011) Genetic transformation of *Salvia ringens* Sibth. et Sm. with *Agrobacterium rhizogenes* in two-phase submerged cultivation system. *Scientific works – University of Food Technologies*, Vol. LVIII(2): 171-176.

Abstract:

Two-phase submerged cultivation in the presence of adsorbent resin Amberlite XAD-4 was applied to prevent negative effects of released phenolic compounds during transformation procedure of *Salvia ringens* Sibth. et Sm with *Agrobacterium rhizogenes*. All the released flavonoids and most of the phenolic acids, having cytotoxic activities, were adsorbed on the resin, which had overall stimulating effects on root development. To our best knowledge, this is the first report for successful *Agrobacterium rhizogenes* transformation of *Salvia ringens* Sibth. et Sm plants.

Резюме:

Приложен е метод на двуфазно дълбочинно култивиране в присъствието на адсорбционна смола Amberlite XAD-4 за адсорбция на секретирани токсични фенолни съединения при генетична трансформация на *Salvia ringens* Sibth. et Sm с *Agrobacterium rhizogenes*. Цялото количество секретирани флавоноиди, както и голяма част от секретирани фенолни киселини са адсорбирани от смолата. Това оказва значителен стимулиращ ефект върху появата и последващото нарастване на образуваниите

трансформирани корени. По наши данни, това е първото съобщение за осъществяване на успешна трансформация на *Salvia ringens* Sibth. et Sm с *Agrobacterium rhizogenes*.

43. Delenk H., Haas C.*, Gantz S., **Marchev A.**, Pavlov A., Steudler S., Unbehaun H., Steingroewer J., Bley T., Wagenführ A. (2015) Influence of *Salvia officinalis* L. hairy roots derived phenolic acids on the growth of *Chaetomium globosum* and *Trichoderma viride*. *Pro Lingo*, 11(4): 268-274.

Abstract:

The influence of *Salvia officinalis* L. hairy roots derived phenolic acids on the growth of two typical cellulose degrading moulds, *Chaetomium globosum* and *Trichoderma viride*, was examined. For this, 26 hairy root lines of *S. officinalis* were induced and investigated with regard to the production of phenolic acids. Pure, commercial phenolic acids, analogues to that biosynthesised in the hairy root cultures, were solved in 96% ethanol and applied to malt extract agar plates. The fungal cultures were transferred to the agar plates, and fungal growth was observed 5 and 12 days after inoculation. The hairy root line A produced the highest amount of total phenolic acids (1582.0µg/g), while line B produced the highest amount of sinapic acid (262.8µg/g). Trans-cinnamic and salicylic acid showed antifungal activity to the growth of *C. globosum*. The growth of this strain was inhibited by vanillic, p-coumaric and sinapic acid. Moreover, it was observed that sinapic acid prevented the spore formation of *C. globosum*. Protocatechuic, sinapic, and salicylic acid inhibited the growth of *T. viride* minimal. Furthermore, only sinapic acid inhibited the spore formation of this mould. The investigations have shown antifungal activity of six *S. officinalis* hairy root derived phenolic acids on malt extract agar plates.

Резюме:

Изследвано е влиянието на фенолни киселини, характерни за трансформирани коренови култури от *Salvia officinalis* L. върху две плесенни гъби, като *Chaetomium globosum* и *Trichoderma viride*, които могат да разграждат целулоза. За тази цел са изследвани 26 линии на трансформирани коренови култури от *S. officinalis*, по отношение на способността им да продуцират фенолни киселини. Фенолните киселини са разтворени в 96% етанол и приложени върху агар от малцов екстракт. Плесенните гъби са трансферирани върху петрита с твърда хранителна среда, а растежа им е анализиран на 5 и 12 дни след инокулиране. Трансформираната коренова линия А продуцира най-високото съдържание на общи фенолни киселини (1582.0 µg/g), докато в линия В е най-високо съдържанието на синапова киселина (262.8 µg/g). Транс-канелената и салициловата киселини имат противоплесенна активност спрямо *C. globosum*. Растежа на този щам също така се потиска от ванилинова, р-кумарова и синапова киселини. Синаповата киселина възпрепятства и формирането на спори в *C. globosum*. Протокатеховата, синаповата и салициловата киселини инхибират растежа на *T. viride minimal*. Само синаповата киселина инхибира формирането на спори от този щам. Изследванията потвърждават и противоплесенната активност на шест от изследваните трансформирани коренови линии на *S. officinalis*, които съдържат споменатите фенолни киселини.