

РЕЗЮМЕТА на публикациите на български език

Референциите на публикациите и техните резюмета са подредени съгласно списъка с публикациите на кандидата.

1. R Tsekovska, E Gatev, R Mironova, S Kerezieva, S Ilieva, T Ilieva, B Vasileva, T Niwa, D Popova, V Vasilev. Serum levels of N^ε-(carboxymethyl)-lysine in chronic kidney disease and diabetes. *Biomedicines* (2025) 13(7), 1672.

РЕЗЮМЕ

Въведение: N^ε-(карбоксиметил)-лизин (CML) се образува в човешкия организъм чрез неензимни реакции, включващи гликиране, окисление и липоокисление. CML е обичаен продукт на нормалната физиология, но нивата му се увеличават при болестни състояния като хронично бъбречно заболяване (ХБЗ) и захарен диабет (ЗД). Свободният CML се елиминира от човешкия организъм главно чрез бъбречната екскреция, а натрупването му в бъбречната тъкан е свързано с патогенезата на ХБЗ. Цел: Основната цел на това проучване е да се оцени относителният принос на ХБЗ и ЗД тип 2 (Т2ЗД) за натрупването на CML в серума на пациентите. Методи: Проучването включва 22 пациенти с ХБЗ без ЗД, 55 с ХБЗ и придружаващ Т2ЗД и 21 с Т2ЗД без ХБЗ. Серумните нива на CML са измерени чрез ELISA. За откриване на разликите между групите е използван тестът на Крускал-Уолис. Беше извършен корелационен анализ на Спирман, а едностранният тест на Дън се считаше за показател за статистическа значимост при $p < 0.05$. Резултати: Медианата на серумните нива на CML (ХБЗ, 658.4 ± 434.3 ng/mL; ХБЗ + Т2ЗД, 431.3 ± 327.9 ng/mL; Т2ЗД, 273.9 ± 134.2 ng/mL) се различава значително ($p < 0.05$) сред трите групи пациенти. Положителна корелация се наблюдава между серумния CML и микроалбуминурията ($p = 0.004$; $r = 0.58$), протеинурията ($p = 0.002$; $r = 0.6$) и възрастта ($p = 0.007$; $r = 0.52$) само при пациентите с ХБЗ. При всички пациенти с Т2ЗД, независимо от ХБЗ статуса, серумният CML корелира отрицателно ($p < 0.05$) с постпрандиалната глюкоза и продължителността на диабета, докато корелацията му с глюкозата на гладно и гликирания хемоглобин е отрицателна само в групата на пациентите с Т2ЗД без ХБЗ. Заключение: При пациентите с ХБЗ се наблюдават по-високи нива на CML в сравнение с тези с Т2ЗД. Серумният CML корелира положително с протеинурията, албуминурията и възрастта на пациентите с ХБЗ без диабет и отрицателно с кръвната глюкоза, гликирания хемоглобин и продължителността на диабета при пациенти с Т2ЗД без ХБЗ.

2. B Vasileva, E Gatev, A Aleksandrov, S Kerezieva, S Ilieva, D Popova, V Vasilev, T Niwa, R Mironova, B Deliyska, R Tsekovska. Serum fructosamine as a marker for glycemic control in patients with diabetic nephropathy. *In Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences* (2024) 77(3): 442-450.

РЕЗЮМЕ

Захарният диабет (ЗД) е метаболитно заболяване, свързано с хроничен недостиг на инсулин или инсулинова резистентност. Прогресирането на ЗД е свързано с дългосрочно увреждане на макро- и микросъдовите системи на организма и причинява сериозни здравословни усложнения. До 40% от пациентите със ЗД развиват хронично бъбречно заболяване (ХБЗ), главно вследствие на диабетна нефропатия (ДН). Ето защо се препоръчва строг гликемичен контрол, за да се забави прогресията на ХБЗ.

Хипергликемията причинява усложнения при пациентите със захарен диабет чрез гликиране на различни протеини. Взаимодействието на глюкозата със свободните аминокислотни групи в белтъците води до образуването на ранния гликиращ продукт фруктозамин (ФА). ФА има кратък полуживот (1 до 2 седмици) и следователно има потенциал да бъде ранен маркер за гликемичен контрол. Въпреки че отдавна се използва в клиничната практика, диагностичното и прогностичното значение на ФА остава под въпрос. В това проучване проверихме потенциала на ФА да служи като гликемичен маркер при пациенти със ЗД и ДН. Установихме, че пациентите със ЗД имат значително по-високи серумни нива на ФА, отколкото недиабетичите. Освен това серумното ниво на ФА при диабетичите корелира положително с концентрацията на глюкоза в кръвта. И накрая, средното серумно ниво на ФА е по-високо при пациентите със ЗД и ДН в сравнение с тези без ДН. Тези резултати показват, че ФА е обещаващ маркер за гликемичен контрол при пациенти с ДН.

3. E Boteva, K Doychev, K Kirilov, Y Handzhiyski, R Tsekovska, E Gatev, R Mironova. Deglycation activity of the Escherichia coli glycolytic enzyme phosphoglucose isomerase. International Journal of Biological Macromolecules (2024) 257(1), 128541.

РЕЗИЮМЕ

Гликирането е спонтанна химична реакция, която засяга структурата и функцията на белтъците при нормални физиологични условия. Затова организмите са развили различни механизми за справяне с гликирането. В настоящото изследване показваме, че гликолитичният ензим фосфоглюкоизомераза (Pgi) на *Escherichia coli* проявява дегликираща активност. Установихме, че *E. coli* Pgi катализира разграждането на Амадори продукти (APs), получени от глюкозо-6-фосфат (G6P), в пилешки лизозим. Афинитетът на Pgi към гликирания лизозим (K_m , 1.1 mM) беше десет пъти по-нисък от афинитета към неговия естествен субстрат — фруктозо-6-фосфат (K_m , 0.1 mM). Въпреки това, високите кинетични константи на ензима с гликирания лизозим (k_{cat} , 396 s⁻¹ и k_{cat}/K_m , 3.6 × 10⁵ M⁻¹ s⁻¹) показват, че амадориазната активност на Pgi може да има физиологично значение. Действително, при използване на тотален белтъчен екстракт от *E. coli* (20 mg/mL) като субстрат в дегликиращата реакция, наблюдавахме освобождаване на G6P от бактериалния белтък със специфична активност на Pgi от 33 μmol/min/mg. Освен това, установихме с 11.4% по-ниска концентрация на APs в белтъчните екстракти от клетки с активен Pgi в сравнение с дефицитни на Pgi клетки ($p = 0.0006$) при условия, при които концентрацията на G6P в клетките с активен Pgi беше четири пъти по-висока от тази в дефицитните клетки ($p = 0.0001$). Всички тези данни сочат към физиологично значение на дегликиращата активност на Pgi.

4. N Jeliaskova, E Longhin, N Yamani, E Rundén-Pran, E Moschini, T Serchi, I Vrček, M Burgum, S Doak, M Cimpan, I Rios-Mondragon, E Cimpan, C Battistelli, C Bossa, R Tsekovska, D Drobne, S Novak, N Repar, A Ammar, P Nymark, V Battista, A Sosnowska, T Puzyn, N Kochev, L Iliev, V Jeliaskov, K Reilly, I Lynch, M Bakker, C Delpivo, A Jiménez, AS Fonseca, N Manier, ML Fernandez-Cruz, S Rashid, E Willighagen, MD Apostolova, M Dusinska. A template wizard for the cocreation of machine-readable data-reporting to harmonize the evaluation of (nano)materials. Nature Protocols (2024) 16 May, 1-43.

РЕЗЮМЕ

Осигуряването на възможност изследователските данни да бъдат намирани, достъпни, оперативно съвместими и повторно използваеми (FAIR) обикновено се затруднява от липса на умения в техническите аспекти на управлението на данни от страна на генериращите данни, както и от недостиг на ресурси. Разработихме помощник за създаване на шаблони (Template Wizard), който позволява на изследователи лесно да създават шаблони, подходящи за последователно улавяне на данни и метаданни от техните експерименти. Шаблоните са лесни за използване и позволяват съставяне на машинно четими метаданни, които да съпътстват генерирането на данни и да ги съгласуват със съществуващи стандарти и бази данни на научната общност, като eNanoMapper, улеснявайки прилагането на принципите на FAIR. Тези шаблони са цитируеми обекти и са достъпни като онлайн инструменти. Помощникът за шаблони е създаден с мисъл за удобството на потребителя и улеснява използването и повторното използване на съществуващи шаблони за нови проекти или разширения на текущи проекти. Към помощника е добавен и онлайн валидатор на шаблони, който позволява самостоятелна проверка на шаблона (за осигуряване на съответствие със схемата на данни и машинна четимост на въведената информация), както и трансформирането ѝ чрез отворен сорс парсър в машинно четими формати, съвместими с принципите на FAIR. Шаблоните са базирани на обширен колективен опит в събирането на данни за нанобезопасност и включват над 60 хармонизирани шаблона за въвеждане на данни, свързани с физикохимична характеристика и оценка на риска (клетъчна жизнеспособност, генотоксичност, тестове за доза-отговор на организми от околната среда, омикс данни), както и изследвания за експозиция и освобождаване. Шаблоните са приложими и в други научни области и вече са разширени и адаптирани за изследвания върху микропластмаси и съвременни материали. Хармонизираните шаблони подобряват надеждността на междулабораторни сравнения, повторното използване на данни и метаанализи и могат да подпомогнат процеса на оценка на безопасността и регулирането на (нано)материали.

5. E Boteva, K Doychev, R Tsekovska, Y Handzhyski, I Ivanov, R Mironova. Protein amadoriase activity of the *Escherichia coli* K-12 glycolytic enzyme phosphoglucose isomerase. In *Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences* (2023), 76(1): 56-64.

РЕЗЮМЕ

Реакцията на Майар (гликиране) е спонтанна неензимна реакция между първични амини и карбонилни съединения, която засяга белтъци и ДНК както при прокариоти, така и при еукариоти. В скорошни изследвания показахме, че гликолитичният ензим фосфоглюкозоизомераза (PGI) на *Escherichia coli* катализира *in vitro* дегликирането на ДНК, модифицирана с Амадори продукти (APs), получени от глюкозо-6-фосфат (G6P). APs са ранни продукти на реакцията на Майар, които се формират не само върху ДНК, но и върху други амини, включително белтъци. Целта на настоящото изследване беше да се провери дали PGI от *E. coli* проявява белтъчна дегликираща (амадориазна) активност. За тази цел използвахме гликиран с G6P пилешки лизозим като моделен белтък. Третирането на гликирания лизозим с белтъчен екстракт от щам на *E. coli*, притежаващ активен PGI (но не и от PGI-дефицитен щам), доведе до освобождаване на G6P — индикатор за амадориазната активност на PGI върху белтъци. APs, получени от G6P, представляват остатъци от фруктозо-6-фосфат (F6P), свързани със свободните аминокрупи на моделния

белтък. Поради това сравнихме кинетичните константи на PGI от *E. coli* за гликирания лизозим и за свободен F6P. PGI демонстрира почти два пъти по-висок афинитет към гликирания лизозим ($K'_m = 0.06 \text{ mM}$), в сравнение със свободен F6P ($K'_m = 0.1 \text{ mM}$). Въпреки това, привидната каталитична константа на ензима с гликирания лизозим ($K'_{cat} = 93 \text{ s}^{-1}$) беше осем пъти по-ниска отколкото с F6P ($K'_{cat} = 736 \text{ s}^{-1}$). Очаква се бъдещи изследвания да хвърлят светлина върху физиологичното значение на докладваната тук амадориазна активност на PGI върху белтъци.

6. R Tsekovska, K Kirilov, A Sredovska–Bozhinov, E Gatev, I Ivanov, T Niwa, R Mironova, Y Handzhyiski. Antiglycation properties of resveratrol and glucosamine. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy* (2023), 58(2): 270-274.

РЕЗЮМЕ

Неензимното гликозилиране (гликиране) е естествен процес, който протича в живите организми и е свързан със стареенето и усложненията при диабет. Тази неензимна реакция засяга не само дълго живущи белтъци, като очния кристалин, но също така и ДНК, РНК и аминокислотни липиди. Дългогодишното търсене на вещества, които могат да потиснат този процес, все още продължава. В настоящото изследване изследвахме ефекта на две природни съединения — ресвератрол и глюкозамин — върху формирането на ранни и флуоресцентни крайни продукти на гликирането (AGEs). Установихме, че ресвератролът инхибира образуването на флуоресцентни AGEs в говежди серумен албумин (BSA), гликиран с D-рибоза, с процент на инхибиране 80 %, докато глюкозаминът инхибира образуването на същите продукти в същата тестова система едва 4 % по отношение на контролната проба гликиран BSA. И двете тествани съединения — ресвератрол и глюкозамин — не инхибираха формирането на ранни продукти на гликиране в гликирания BSA. Нашите резултати показаха, че ресвератролът има силна антигликираща активност, за разлика от глюкозамина, който демонстрира много нисък антигликиращ потенциал.

7. R Tsekovska, K Kirilov, E Gatev, R Mironova, Y Handzhyiski. Investigation of purine compounds for anti-glycation activity in vitro. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy* (2022), 57 (1): 19-24.

РЕЗЮМЕ

Неензимното гликозилиране (гликиране) е процес, характерен за всички живи организми. Той е свързан с натрупването на гликиращи продукти в белтъци, аминокислотни липиди и ДНК, което потенциално може да доведе до нарушаване на техните биологични функции. Поради това различни вещества са били изследвани за възможна антигликираща активност. Някои от тези вещества, като аминокислотин, са установени като мощни инхибитори на гликирането *in vitro/ex vivo* и в животински модели. Въпреки това, поради странични ефекти на аминокислотина, клиничните изпитвания във фаза II на този медикамент са били прекратени. В това изследване проучихме влиянието на шест пуринови съединения (теобромин, теофилин, кофеин, ксантин, хипоксантин и пикочна киселина) върху формирането на флуоресцентни гликиращи продукти, както и върху ковалентната агрегация на говежди серумен албумин (BSA) гликиран с D-рибоза *in vitro*. Най-силна инхибиторна активност (около 50% инхибиране) бе наблюдавана при теофилин и ксантин, следвани от теобромин и хипоксантин. Кофеинът имаше неутрален ефект

върху гликирането, докато пикочната киселина прояви ясна прогликираща активност. Тя засили образуването на флуоресцентни адукти в BSA до 125% спрямо изходната контрола и увеличи ковалентната агрегация на този белтък.

8. S Engibarov, R Tsekovska, K Kirilov, E Gatev, I Ivanov, R Mironova, Y Handzhyiski. Deoxyribonuclease activity of allenic acids. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy* (2022), 57(2): 291-297.

РЕЗЮМЕ

Неензимното срязване на нуклеинови киселини (ДНК или РНК) е от съществено значение за разработването на нови антибиотици и химиотерапевтични средства, както и за нови техники за генна манипулация. В настоящото проучване изследвахме дезоксирибонуклеазната активност на аленовите киселини 2-метил-4-фенилхекса-2,3-диенова киселина (рацемична смес, АК-1), S-2-метил-4-фенилбута-2,3-диенова киселина (АК-2) и R-2-метил-4-фенилбута-2,3-диенова киселина (АК-3), използвайки суперспирална плазмидна pUC18 ДНК като субстрат. И трите аленови киселини демонстрираха еднородна дезоксирибонуклеазна активност в следния ред: АК-2 $\geq$ АК-3 > АК-1. Повишаването на концентрацията на калиево-фосфатен буфер (pH 7.5) в реакционната смес напълно инхибира релаксацията на суперспиралната ДНК от pUC18, което предполага, че фосфодиестерната връзка в ДНК е уязвимото място за атака от страна на аленовите киселини. Когато плазмидната pUC18 ДНК, срязана с аленови киселини, беше третирана с T4 ДНК-лигаза, тя не възстанови своята ковалентно затворена кръгова форма. Това показва, че аленовите киселини действат или като хидролитични агенти, произвеждащи 3'-PO₄ и 5'-ОН краища, или като окислителни, увреждащи ДНК чрез механизъм, включващ свободни радикали.

9. AS Jiménez, R Puelles, M Pérez-Fernández, L Barruetabeña, N Raun Jacobsen, B Suarez-Merino, C Micheletti, N Manier, B Salieri, R Hischier, R Tsekovska, Y Handzhyiski, J Bouillard, Y Oudart, KS Galea, S Kelly, N Shandilya, H Goede, J Gomez-Cordon, KA Jensen, Martie van Tongeren, MD Apostolova, I Rodriguez-Llopis. Safe(r) by design guidelines for the nanotechnology industry. *NanoImpact* (2022), 25: 100385.

РЕЗЮМЕ

Очакванията за по-безопасни и устойчиви химикали и продукти нарастват, за да отговорят на Европейските и ООН стратегии за устойчивост. Прилагането на принципа „Безопасност чрез дизайн“ (Safe(r) by Design, SbD) в нанотехнологиите предполага повтарящ се процес, при който функционалност, човешко здраве и безопасност, екологично и икономическо въздействие и разходи се оценяват и балансират възможно най-рано в процеса на иновация и се актуализират на всеки етап. Проектът на ЕС H2020 NanoReg2 беше първият Европейски проект за прилагане на SbD в шест компании, работещи с и/или произвеждащи наноматериали (nanomaterials, NMs) и продукти базирани на нанотехнологии (nano-enabled products, NEP).

Резултатите от този опит бяха използвани за разработването на настоящите насоки за практическото прилагане на SbD. Подходът SbD предвижда идентифициране, оценка и намаляване на рисковете за човешкото здраве и околната среда възможно най-рано в процеса на разработка на NM или NEP и се основава на три стълба: (i) по-безопасни NMs

и NEP; (ii) по-безопасна употреба и край на жизнения цикъл и (iii) по-безопасно промишлено производство. Представените насоки включват набор от информация и инструменти, които ще помогнат да се вземе решение на всеки етап от иновационния процес дали да се продължи, да се приложат SbD мерки или да се извършат допълнителни тестове за намаляване на несигурността. Те не представляват задължителен протокол, при който всички препоръчани стъпки трябва да бъдат следвани, за да се постигне SbD NM/NEP или процес. Вместо това, насоките са предназначени да подпомогнат ранното идентифициране на рискове и на необходимата информация за тяхното разпознаване. Всяка компания адаптира подхода според своите специфични нужди и обстоятелства, като взетите решения влияят върху по-нататъшния ход на действие.

10. R Tsekovska, R Mironova, I Ivanov. Protein glycosylation in bacteria. *C R Acad Bulg Sci* (2021), 74(4): 467-487.

РЕЗЮМЕ

Гликозилирането може общо да се определи като присъединяване на въглехидратни остатъци към биомолекули като белтъци, нуклеинови киселини и др. В живите системи съществуват два основни типа гликозилиране – ензимно и неензимно. Последният тип се нарича още гликиране или реакция на Майар. В настоящия обзор терминът „гликозилиране“ се използва, за да обозначи ензимното гликозилиране, а „гликиране“ – за да посочи неензимния процес. Двата типа гликозилиране се различават по участието (или липсата) на ензимни катализатори. Основната разлика между тях обаче се отнася до тяхното физиологично значение. Ензимната катализа предполага генетично кодиран процес, който е от съществено значение за структурата, стабилността и функцията на биомолекулите. Обратно, гликирането е спонтанна, но неизбежна химична реакция, която компрометира структурата и функцията на засегнатите молекули. Дълго време се е смятало, че и двата процеса, гликозилиране и гликиране, се осъществяват само при еукариоти. Причината за това е, че прокариотите са лишени от органели, в които да се извършва гликозилиране, а краткият им жизнен цикъл не позволява протичане на гликиране. Откриването обаче на гликозилирани белтъци в домейни Археи и Бактерии през 1976 г., както и откриването на неензимно гликозилиране в *Escherichia coli* в нашата лаборатория през 2001 г., опровергават тези вярвания. Настоящият обзор е посветен на ензимния тип белтъчно гликозилиране в бактерии.

11. A Giusti, R Atluri, R Tsekovska, A Gajewicz, MD Apostolova, CL Battistelli, EAJ Bleeker, C Bossa, J Bouillard, M Dusinska, P Gómez-Fernández, R Grafström, M Gromelski, Y Handzhiyski, N Raun Jacobsen, P Jantunen, K Alstrup J, A Mech, J Maria Navas, P Nymark, AG Oomen, T Puzyn, K Rasmussen, C Riebeling, I Rodriguez-Lopis, S Sabella, JR Sintes, B Suarez-Merino, S Tanasescu, H Wallin, A Haase. Nanomaterial grouping: Existing approaches and future recommendations. *NanoImpact* (2019), 16: 100182.

РЕЗЮМЕ

Физикохимичните свойства на произведените наноматериали (NMs) могат да бъдат прецизно регулирани, за да се постигнат различни функционалности в отговор на нуждите на конкретни индустриални приложения. Физикохимичните свойства на NMs също

определят и биологичните им взаимодействия. Поради това всеки NM изисква адекватна физикохимична характеристика и потенциално обширна и продължителна (еко)токсикологична оценка, в зависимост от нормативните изисквания. Подходите на групиране и аналогия (read-across), които вече са добре установени за химикалите като цяло, се основават на сходство между вещества и могат да се използват за запълване на пропуски в данните без да се извършва допълнително тестване. По този начин наличните данни за „изходните“ химикали се използват за предсказване на съдбата, токсикокинетиката и/или (еко)токсичността на структурно сходни „целеви“ химикал(и). За NMs подобни подходи тепърва започват да се развиват и остават няколко предизвикателства, включително идентифицирането на най-подходящите физикохимични свойства, които да подкрепят твърдението за сходство. Като цяло, NMs изискват допълнителни параметри за правилно физикохимично описание. Освен това, някои параметри се променят по време на жизнения цикъл на NM, което предполага, че и токсикологичният профил може да се промени.

В настоящата статия се сравняват съществуващите концепции за групиране на NM, като се разглеждат основните им принципи и критерии, както и тяхната приложимост за регулаторни и други цели. Представени са перспективи и препоръки, базирани на опита натрупан по време на ЕС проект NanoReg2 по програма „Хоризонт 2020“. Те включват, например, значението на хармонизирани системи за съхранение на данни, прилагането на хармонизирани оценяващи системи за сравняване на биологични отговори и използването на високопроизводителни и други скрининг подходи. Включени са и препратки към други текущи ЕС проекти, които се занимават с някои от тези предизвикателства.

12. A Mech, K Rasmussen, P Jantunen, L Aicher, M Alessandrelli, U Bernauer, EAJ Bleeker, J Bouillard, P Di Prospero Fanghella, R Draisci, M Dusinska, G Encheva, G Flament, A Haase, Y Handzhiyski, F Herzberg, J Huwyler, NR Jacobsen, V Jeliaskov, N Jeliaskova, P Nymark, R Grafström, AG Oomen, ML Polci, C Riebeling, J Sandström, B Shivachev, S Stateva, S Tanasescu, R Tsekovska, H Wallin, MF Wilks, S Zellmer, MD Apostolova. Insights into possibilities for grouping and read-across for nanomaterials in EU chemicals legislation. *Nanotoxicology* (2019), 13(1): 119-141.

РЕЗЮМЕ

Този документ представя обстоен преглед на законодателството на Европейския съюз (ЕС), регулиращо безопасността на химичните вещества и възможностите в рамките на всеки законодателен акт за прилагане на подходи за групиране и аналогия (read-across) при оценката на наноматериали (NMs). В този контекст се разглежда както общата нормативна уредба за химични вещества съгласно REACH (Регламент (ЕО) № 1907/2006 относно регистрация, оценка, разрешаване и ограничаване на химикали) и CLP (Регламент (ЕО) № 1272/2008 относно класификация, етикетиране и опаковане на вещества и смеси), така и секторно специфични законодателни актове за козметични продукти, продукти за растителна защита и биоциди, както и законодателството, свързано с храни, нови храни и материали в контакт с храни. Бяха идентифицирани и анализирани съответните придружаващи документи (напр. документи с насоки) по отношение на всеки законодателен акт, като се взеха предвид съответната техническа и научна литература. Установени бяха и бъдещи регулаторни потребности за прилагане на групиране при оценка на NMs, както и отговорът на въпроса дали всеки конкретен законодателен акт

позволява използването на подходи за групиране и аналогия за запълване на информационни пропуски.

13. R Tsekovska, M Boyanova, R Mironova, I Ivanov. Impact of glycation inhibitors on the biologic activity of recombinant human interferon-gamma. *Biotechnology& Biotechnological Equipment* (2012), 26(1): 170-174.

РЕЗЮМЕ

Гликирането на рекомбинантен човешки интерферон-гама (rhIFN- γ) предизвиква конформационни изменения в молекулата и води до намаляване на неговата биологична активност. Целта на настоящото изследване беше да се открият подходящи подходи за предотвратяване на гликирането с оглед получаването на стабилен рекомбинантен белтък със запазена биологична активност. За тази цел беше изследван ефектът на седем химични съединения (ацетилсалицилова киселина, витамин B1, аминогуанидин, аргинин, пиридоксин, пиридоксал 5'-фосфат и пиридоксамин) върху биологичната активност на rhIFN- γ , продуциран в *Escherichia coli*. Получените резултати показаха, че rhIFN- γ , изолиран от бактериални клетки, култивирани в присъствие на 0.1 mM ацетилсалицилова киселина, е най-слабо повлиян от гликиране. Той демонстрира висока стабилност в разтвор и биологична активност от приблизително 2×10^6 IU/mg в рамките на три месеца съхранение при -20°C.

14. R Tsekovska, M Boyanova, R Mironova, I Ivanov. Effect of arginine on glycation and stability of recombinant human interferon-gamma. *Biotechnology&Biotechnological Equipment* (2009), 23(1): 1063-1067.

РЕЗЮМЕ

Рекомбинантен човешки интерферон-гама (rhIFN- γ), произведен в *Escherichia coli* (*E. coli*), претърпява структурни и функционални изменения в резултат на два различни, но паралелни процеса – агрегация и неензимно гликозилиране (гликиране). Откриването на подходи за тяхното инхибиране е от съществено значение за качеството на rhIFN- γ . В настоящото изследване използвахме аргинин с тази цел. Установихме, че добавянето на аргинин към хранителната среда на *E. coli* инхибира формирането на флуоресцентни гликиращи адукти и имидазолон в тоталния бактериален белтък, но не възпрепятства ранните етапи на гликиране. В допълнение, ренатурация и съхранение на rhIFN- γ в присъствието на аргинин доведе до забавено натрупване на N^ε-(карбоксиметил)лизин и структурна стабилизация на рекомбинантния белтък.

15. G Stoynev, R Dimitrova, L Srebrevna, R Mironova, I Ivanov. Glycation in Escherichia coli: Detection of glycating compounds using histone H1 as a substrate. *C R Acad Bulg Sci* (2004), 57(9): 77-82.

РЕЗЮМЕ

Гликирането е кондензационна реакция между редуциращи захари и първични аминогрупи в белтъците. То протича на много етапи, водейки до образуване на обратими Шифови бази, продукти на Амадори и накрая до необратими продукти, наречени крайни продукти на гликиране (AGEs). Гликирането е широко изследвано във връзка с диабета и

стареенето. Поради широко разпространеното разбиране, че това е бавен процес при физиологични условия, засягащ дълго живущи белтъци, до скоро гликирането не е било изследвано при прокариоти. Наши скорошни данни обаче показаха, че гликиране се извършва и в бактерии. Целта на настоящото изследване е да провери дали бактериалният цитозол съдържа гликиращи съединения. Използвайки хистон H1 като субстрат за гликиране, показахме, че инкубирането на хистон H1 (поставен в диализни торбички) в бактериални лизати води до натрупване както на ранни, така и на късни (AGEs) продукти на гликиране. Това означава, че гликиращите съединения на *Escherichia coli* са нискомолекулни вещества, разтворени в бактериалната цитоплазма.

16. R Mironova, T Niwa, R Dimitrova, M Boyanova, I Ivanov. Glycation and post-translational processing of human interferon-gamma expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* (2003), 278(51): 51068-51074.

РЕЗИЮМЕ

Доскоро се смяташе, че неензимното гликозилиране (гликиране) засяга само белтъците на дълго живущите еукариоти. Въпреки това, в скорошно изследване (Mironova, R., Niwa, T., Hayashi, H., Dimitrova, R., and Ivanov, I. (2001) *Mol. Microbiol.* 39, 1061–1068), ние показахме, че гликиране се извършва и в *Escherichia coli*. В настоящото изследване демонстрираме, че пост-транслационните изменения (протеолиза и ковалентна димеризация), наблюдавани при рекомбинантен човешки интерферон- γ без цистеинови остатъци (rhIFN- γ), са тясно свързани с неговото гликиране *in vivo*. Нашите резултати показват, че в момента на изолиране, rhIFN- γ съдържа ранни (но не и крайни) продукти на гликиране. Използвайки високоефективна течна хроматография с обратна фаза в съчетание с флуоресцентни измервания, ензимно-свързан имуносорбентен анализ и маспектрометрия, установихме, че крайни продукти на гликиране се появяват в rhIFN- γ по време на съхранение. Последните бяха идентифицирани основно в богатия на Arg/Lys C край на белтъка, който също така беше основна мишена на протеолиза. Маспектралният анализ и N-крайното секвениране разкриха четири основни (Arg¹⁴⁰ ↓ Arg¹⁴¹, Phe¹³⁷ ↓ Arg¹³⁸, Met¹³⁵ ↓ Leu¹³⁶ и Lys¹³¹ ↓ Arg¹³²) и две второстепенни (Lys¹⁰⁹ ↓ Ala¹¹⁰ и Arg⁹⁰ ↓ Asp⁹¹) места на разцепване в този регион. Картографирането на триптичните пептиди показва, че ковалентните димери на rhIFN- γ , възникващи по време на съхранение, се формират главно чрез напречно омрежаване на мономерните субединици. Антивирусният анализ показва, че протеолизата понижава антивирусната активност на rhIFN- γ , докато ковалентната димеризация я премахва напълно.

17. Y Handzhiyski, Tsekovska, K Kirilov, T Niwa, I Ivanov, R Mironova. Enhancing effect of L-lysine on glycation of histone H1 and bovine serum albumin *in vitro*. Chapter 3 in: A Closer Look at Glycation: A Potential Hotspot for Age-related Complications and Diseases, Nova Science Publishers, Inc, NY, USA (2021), 79-98, ISBN: 978-1-53619-176-9.

РЕЗИЮМЕ

Гликирането е неензимна посттранслационна реакция между първични аминогрупи в белтъци и редуциращи захари, в резултат на която се образуват крайни продукти на гликиране (AGEs). Тази реакция допринася за много усложнения при диабетни пациенти, както и за други патофизиологични процеси при хората. Поради това досега са изследвани

редица нискомолекулни аминокислотни и карбонилни съединения за инхибиращ ефект върху гликирането. Данните, получени с L-лизин, са противоречиви и все още не е ясно дали L-лизин инхибира или усилва гликирането. Гликирането протича на няколко етапа и затова L-лизин може да оказва различно въздействие върху различните етапи от реакцията на гликиране. С оглед на това съсредоточихме вниманието си върху ефекта на L-лизин в напредналата фаза на гликирането. Установихме, че L-лизин усилва образуването на флуоресцентни AGEs в хистон H1 от плъх и в говежди серумен албумин, гликирани съответно с глюкозо-6-фосфат и D-рибоза. Хистон H1 също така претърпя ускорена ковалентна агрегация и протеолиза в присъствието на L-лизин. Допълнително беше установено, че ресвератрол потиска усиливащия ефект на L-лизин върху образуването на AGEs в BSA, което предполага, че този ефект е зависим от окисление. В заключение, L-лизин изглежда неподходящ за инхибиране на гликирането *in vivo*, тъй като свръхдозите могат да ускорят патологични процеси, свързани с гликирането.

18. E Popova, L Zagorchev, R Tsekovska, R Mironova, M Odjakova. Protective role of salinity against the accumulation of advanced glycation end products in embryogenic suspension cultures of *Dactylis glomerata* L. Chapter 5 in: Advanced Glycation End-Products: Sources and Effects, Nova Science Publishers, Inc, NY, USA (2020), 105-126, ISBN:978-1-53617-555-4

РЕЗЮМЕ

Неензимното гликозилиране (гликиране) на белтъци води до образуването на крайни продукти на гликиране (AGEs), които необратимо модифицират белтъците и нарушават тяхната функция. Различни абиотични стресови фактори при растенията причиняват свръхпроизводство на реактивни кислородни видове, за които е известно, че ускоряват гликирането. Въпреки това, гликирането на белтъци в растения в условия на стрес все още не е изследвано. В това проучване модифицирахме поли-L-лизин с AGEs и го използвахме като антиген за генериране на моноклонално антитяло с едноверижен променлив фрагмент (scFv mAb) чрез технологията на фагов дисплей. scFv mAb демонстрира силно и специфично свързване с антигена и беше използвано за изследване на гликирането на белтъци в ембриогенни суспензионни култури на *Dactylis glomerata* L., подложени на умерен (0.085 M NaCl) или силен (0.17 M NaCl) солеви стрес. Установихме отрицателна корелация между нивата на AGEs във вътре- и извънклетъчните белтъци на *D. glomerata* L. и концентрацията на NaCl в суспензионните култури, което сочи към защитната роля на солеността срещу гликиране.

19. R Tsekovska, Y Handzhiyski, E Boteva, K Kirilov, T Niwa, I Ivanov, R Mironova. Advanced glycation end products in *Escherichia coli*: A sign of aging. Chapter 5 in: Advances in Medicine and Biology, Nova Science Publishers, Inc. NY, USA (2017), 118:51-81, ISBN: 978-1-53611-010-4.

РЕЗЮМЕ

Скорошни изследвания оспориха парадигмата, че бактериите не остаряват и са безсмъртни. Stewart и съавт. (PLoS Biology, 2005, 3(2), e45) представиха интригуващо доказателство, че по време на делене *Escherichia coli* K-12 проявява функционална асиметрия, при което остава майчина клетка със забавен растеж и преживяемост и по-

млада дъщерна клетка, способна успешно да продължи вида във времето. С оглед на това ново откритие, бактериите, и в частност *E. coli*, се открояват като обещаващ модел за изследване на основните механизми на стареене. Все още не е ясно до каква степен про- и еукариотните клетки остаряват по сходен начин, но поне някои белези на стареенето, особено на молекулярно ниво, би трябвало да са общи. Спонтанните химични реакции, включително хидролиза, окисление и гликиране (реакция на Майяр), са добре известни с това, че увреждат макромолекулната структура и функция. Реакцията на Майяр, при която се образуват т. нар. крайни продукти на гликиране (AGEs) в белтъци, ДНК и аминокиселини, отдавна се свързва със заболявания (диабет, Алцхаймер и Паркинсон) и стареене при хората. Ние показахме, че въпреки краткия жизнен цикъл на *E. coli*, който е от десетки минути до няколко часа, хромозомната ѝ ДНК натрупва AGEs при нормални условия на растеж (Mironova et al., Mol. Microbiol., 2005, 55(6), p1801). Такова прогресивно модифициране на ключова биологична молекула предоставя независима линия на доказателство за стареенето на *E. coli*. Тази статия преглежда данни за реакцията на Майяр като причина за стохастични увреждания при *E. coli* и съответно за стареене на *E. coli*.

20. R Tsekovska, A Sredovska-Bozhinov, T Niwa, I Ivanov, R Mironova. Maillard reaction and immunogenicity of protein therapeutics. World Journal of Immunology, Baishideng Publishing Group, (2016), 6(1): 19-38.

РЕЗЮМЕ

Рекомбинантната ДНК технология даде възможност за производството на различни човешки терапевтични белтъци. Натрупаният клиничен опит обаче показва, че образуването на антитела срещу такива белтъци е общо явление, а не изключение. Имуногенността на терапевтичните протеини води до неефективна терапия и до развитие на нежелани, понякога животозастрашаващи, странични реакции. Човешките протеини, предназначени за клинично приложение, обикновено имат същата аминокиселинна последователност като своите естествени прототипи, но все още не е напълно изяснено какви са причините за тяхната имуногенност. В предишни изследвания ние за първи път демонстрирахме, че фармацевтичните форми на интерферон-бета (IFN- β), използвани за лечение на пациенти с множествена склероза, съдържат напреднали продукти на гликиране (AGEs), които допринасят за имуногенността на IFN- β . AGEs са крайни продукти на химична реакция, известна като реакция на Майяр или гликиране, чиято роля в имуногенността на белтъчните лекарства досега е била пренебрегвана. Следователно целта на настоящата статия е да представи цялостен преглед на реакцията на Майяр, като се акцентира върху експерименталните данни и теоретичните съображения, които показват защо реакцията на Майяр заслужава специално внимание в контекста на добре документираната имуногенност на белтъчните лекарства.

21. A Sredovska-Bozhinov, R Tsekovska, Y Handzhiyski, R Mironova. Interferon-beta for treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: Problems and Perspectives. International Journal of Recent Research in Arts and Sciences (2015), 4: 407-416.

РЕЗЮМЕ

Терапевтични протеини като човешкия интерферон-бета (IFN β) могат да предизвикат имунен отговор при лекуваните пациенти. Развитието на имунна непоносимост е бавен

процес, при който честотата на поява и количеството на антителата варират значително – от ниски нива в повечето случаи до много високи в други. В много случаи антителата нямат клинични последици, но често, заедно със загубата на активността на лекарството, те могат да неутрализират активността на ендегенните аналози на лекарството и да предизвикат имунни реакции у лекуваните пациенти, като грипозни симптоми, алергии, анафилаксия и серумна болест. В този обзор ние се фокусираме върху проблемите, свързани с имуногенността на човешкия IFN β , използван за лечение на пристъпно-ремитентна множествена склероза, и очертаваме перспективите за производство на по-слабо имуногенни терапевтични протеини.

22. R Dimitrova, R Mironova, I Ivanov. Formation of 3-deoxyglucosone in Escherichia coli. In: Proceedings (Human Medicine) of the Scientific Conference with International Participation, St. Zagora, June 3-4, (2004), 4:96-100.

РЕЗЮМЕ

В процеса на неензимно гликозилиране (гликиране) се образуват високо реактивоспособни α -дикарбонилни съединения, наречени α -оксоалдехиди, които участват в образуването на крайните продукти на гликиране. Към тези съединения се отнасят 3-деоксиглюкозон, глиоксал и метилглиоксал, описани засега само при еукариоти. В предишни наши изследвания показахме, че процесът на гликиране в бактерии зависи от тяхната метаболитна активност. В настоящото изследване проследяваме зависимостта на процеса от типа хранителна среда (богата или бедна), с цел да покажем, че бактериалната цитоплазма съдържа вещества с гликиращ потенциал. Това от своя страна доведе до изследване на бактериалния цитозол директно за съдържание на гликиращи агенти и в частност на 3-деоксиглюкозон.