



# PROCEEDINGS



## THE XV<sup>TH</sup> WORKSHOP ON BIOLOGICAL ACTIVITY OF METALS, SYNTHETIC COMPOUNDS AND NATURAL PRODUCTS

09 DECEMBER 2020

SOFIA, BULGARIA

ISSN 2367-5683



**P R O C E E D I N G S**  
**OF THE XV<sup>th</sup> WORKSHOP ON BIOLOGICAL ACTIVITY OF  
METALS, SYNTHETIC COMPOUNDS AND NATURAL PRODUCTS**

**09 December 2020**

**Institute of Experimental Morphology, Pathology and Anthropology with  
Museum  
at the Bulgarian Academy of Sciences**

**Edited by: Dimitar Kadiysky and Radostina Alexandrova**

***Supported by:***

- **Institute of Experimental Morphology, Pathology and Anthropology with Museum, Bulgarian Academy of Sciences**
- **Fund “Scientific Research”, Bulgaria, Grant № ДКОСТ 01 10 from 22.10.2018**

**THE FIFTEENTH WORKSHOP**  
**“BIOLOGICAL ACTIVITY OF METALS, SYNTHETIC COMPOUNDS**  
**AND NATURAL PRODUCTS”**

**IS ORGANIZED BY THE INSTITUTE OF EXPERIMENTAL MORPHOLOGY,**  
**PATHOLOGY AND ANTHROPOLOGY WITH MUSEUM (IEMPAM)**

**UNDER THE AUSPICES OF**  
**THE BULGARIAN ACADEMY OF SCIENCES**

**ORGANIZING COMMITTEE**

**CHAIRPERSONS:**

SVETLOZARA PETKOVA  
(IEMPAM – BAS)

RADOSTINA ALEXandroVA  
(IEMPAM – BAS)

**MEMBERS:**

NINA ATANASSOVA (IEMPAM – BAS)

DIMITAR KADIYSKY (IEMPAM – BAS)

MARGARITA GABRASHANSKA (IEMPAM – BAS)

MASHENKA DIMITROVA (IEMPAM – BAS)

RENETA TOSHKOVA (IEMPAM – BAS)

**CO-ORGANIZERS**

RENI KALFIN (INSTITUTE OF NEUROBIOLOGY, BULGARIAN ACADEMY OF SCIENCES)

GEORGE MILOSHEV (INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY, BULGARIAN ACADEMY OF SCIENCES)

ANDREY TCHORBANOV (THE STEPHAN ANGELOFF INSTITUTE OF MICROBIOLOGY, BULGARIAN ACADEMY OF SCIENCES)

STEFKA TEPAVITCHAROVA (INSTITUTE OF GENERAL AND INORGANIC CHEMISTRY,

NELI KOSEVA (INSTITUTE OF POLYMERS, BULGARIAN ACADEMY OF SCIENCES)

GALINA KURTEVA (NATIONAL SPECIALIZED HOSPITAL FOR ARCIVE TREATMENT IN ONCOLOGY, SOFIA)

KONSTANTA TIMCHEVA (MULTI-PROFILE HOSPITAL FOR ACTIVE TREATMENT “NADEZHDA”)

JULIA RADENKOVA – SAEVA (TOXICOLOGY CLINIC, UMHATEM “PIROGOV”)

STOYAN SHISHKOV (FACULTY OF BIOLOGY, SOFIA UNIVERSITY “KLIMENT OHRIDSKI”)

IVO GRABCHEV (FACULTY OF MEDICINE, SOFIA UNIVERSITY “KLIMENT OHRIDSKI”)

ANNA TOLEKOVA (MEDICAL FACULTY, TRAKIA UNIVERSITY, STARA ZAGORA)

BORYANA RUSEVA (MEDICAL UNIVERSITY, PLEVEN)

STEFKA VALCHEVA-KUZMANOVA (FACULTY OF MEDICINE, MEDICAL UNIVERSITY - VARNA)

## **YOUNG SCIENTISTS COMMITTEE**

ABEDULKADIR ABUDALLEH (IEMPAM – BAS)

TANYA ZHIVKOVA (IEMPAM – BAS)

BOYKA ANDONOVA-LILOVA (IEMPAM – BAS)

IVELIN VLADOV (IEMPAM – BAS)

DESLAV DINEV (IEMPAM – BAS)

LORA DYAKOVA (INSTITUTE OF NEUROBIOLOGY – BAS)

KATYA POPOVA (FACULTY OF BIOLOGY, SOFIA UNIVERSITY “ST. KLIMENT OHRIDSKI”, INSTITUTE FOR NUCLEAR RESEARCH AND NUCLEAR ENERGY – BULGARIAN ACADEMY OF SCIENCES, SOFIA, BULGARIA)

ANTONIYA NIKOLOVA (FACULTY OF MEDICINE, SOFIA UNIVERSITY “ST. KLIMENT OHRIDSKI”)

PENCHO BEYKOV (FACULTY OF CHEMISTRY AND PHARMACY, SOFIA UNIVERSITY “ST. KLIMENT OHRIDSKI”)

DANIELA-CRISTINA CULITA (INSTITUTE OF PHYSICAL CHEMISTRY “ILIE MURGULESCU”, BUCHAREST, ROMANIA)

MARGARITA DOSINA (INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES – BELARUS)

VILENA ALEXEEVA (ST. PETERSBURG RESEARCH INSTITUTE OF GUM AND RUBBER “S.V. LEBEDEVA” AND INSTITUTE OF SILICATE CHEMISTRY OF RUSSIAN ACADEMY SCIENCES)

## **INTERNATIONAL ADVISORY BOARD**

VLADIMIR KULCHITSKY (INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES – BELARUS)

OTILIA COSTISOR (INSTITUTE OF CHEMISTRY, ROMANIAN ACADEMY, TIMISOARA, ROMANIA)

LUMINITA PATRON (INSTITUTE OF PHYSICAL CHEMISTRY “ILIE MURGULESCU”, BUCHAREST, ROMANIA)

NABANITA SAHA (TOMAS BATA UNIVERSITY, ZLIN, CZECH REPUBLIC)

MILENA FINI (ISTITUTO ORTOPEDICO RIZZOLI, BOLOGNA, ITALY)

CLARA VINAS (INSTITUT DE SIENCIA DE MATERIALS DE BARCELONA, BARCELONA, SPAIN)

JAN STENVANG (FACULTY OF HEALTH AND MEDICAL SCIENCES, UNIVERSITY OF COPENHAGEN, DENMARK)

CRTOMIR PODLIPNIK (FACULTY OF CHEMISTRY AND CHEMICAL TECHNOLOGY, UNIVERSITY OF LJUBLJANA, SLOVENIA)

GUNAY YETIK-ANACAK (FACULTY OF PHARMACY, EGE UNIVERSITY, IZMIR, TURKEY)

VIRGINIJA JANKAUSKAITE (KAUNAS UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, KAUNAS, LITHUANIA)

JELENA KRASILNIKOVA (RIGAS STRADIN UNIVERSITY, RIGA, LATVIA)

OLAFUR SIRURJONSSON (DEPARTMENT OF SCIENCE AND ENGINEERING. REYKJAVIK UNIVERSITY, ICELAND)

DARINA LAZAROVA (THE COMMONWEALTH MEDICAL COLLEGE, SCRANTON, PA, USA)

OSAMA AZMY (MEDICAL RESEARCH DIVISION, INSTITUTE OF NATIONAL RESEARCH CENTRES, GIZA, EGYPT)

**The responsibility for the content of published papers/abstracts belongs entirely to their authors**

**Поради епидемиологичната обстановка в страната вследствие на пандемията COVID-19, Работната среща беше проведена дистанционно**

## The Program of the Workshop

<b>In the small world of the molds from the genus <i>Fusarium</i>.</b> Katerina Todorova.....	5
<b>Cytotoxic effect of Lovastatin and Fluvastatin in retrovirus-transformed rat sarcoma cells.</b> Milena Glavcheva, Zdravka Petrova, Rossen Spasov, Radostina Alexandrova.....	11
<b>Биологична активност на мед.</b> Десислав Динев, Абдулкадир Абудаллах, Радостина Александрова.....	25
<b>Биологична активност на кобалт.</b> Десислав Динев, Абдулкадир Абудаллах, Радостина Александрова.....	33
<b>Evaluation of male reproduction in conditions of experimentally induced hyperglycemia in rat.</b> Pavlova E., Vladov I., Zapryanova S., Petrova, E., Gluhcheva, Y., Atanassova N.....	41
<b>Preliminary study of the antiparasitic effect of snail hemocyanins and mucus on mice infected experimentally with <i>Trichinella pseudospiralis</i>.</b> Katerina Todorova, Ivelin Vladov, Valeria Dilcheva, Ani Georgieva, Reneta Toshkova, Ivan Iliev, Pavlina Dolashka and Svetlozara Petkova.....	42
<b>Physiological responses of pea plants to treatment with synthetic auxins and auxin-type herbicide.</b> Dessislava Todorova, Iskren Sergiev, Elena Shopova, Liliana Brankova, Jurga Jankauskiene, Sigita Jurkonienė, Virgilija Gavelienė, Rima Mockevičiūtė.....	44
<b>Assessment of application of selective herbicide on biochemical responses of young wheat seedlings grown under drought stress.</b> Iskren Sergiev, Zornitsa Katerova, Elena Shopova, Liliana Brankova, Ljudmila Dimitrova, Dessislava Todorova.....	45
<b>Bacterial pathogen <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> alter oxidative defence system in Pepper plants (<i>Capsicum annum</i> L.).</b> Brankova L., Kizheva Y., Rasheva I., Hristova P., Urshev Z., Ivanov S., Shopova E.....	46

# In the small world of the molds from the genus *Fusarium*

Katerina Todorova

*Institute of Experimental Morphology, Pathology and Anthropology with Museum,  
Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria, Acad. G. Bonchev Str., Bl. 25, 1113,  
Sofia, Bulgaria*

e-mail: katerinagencheva@yahoo.com

## Abstract

Molds from the genus *Fusarium* are fungal species, multi-cellular mycelium organisms, adapted to almost every corner of our planet including human and animal food and feed products. Molds can cause two groups of diseases: mycoses - by colonizing the host organism mycotoxicoses-acute and chronic food –borne diseases and poisonings. The most common in nature of the representatives of the genus *Fusarium* are: *F. graminearum*, *F. verticillioides* (*moniliforme*), *F. poae*, *F. equiseti*, *F. culmorum*, *F. sporotrichoides*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. solani* and others, which are widespread in all climatic zones. Predisposing factors for their development of these fungi are high temperatures and humidity, problems in the agronomic measures and crop storage, insects and others. *Fusarium* molds produce three main groups of mycotoxins - fumonisins, trichothecenes and zearalenone, which are of a great economic and health risk value, because of the various effect and diseases and are in the focus of research priorities of the World Health Organization (WHO) and European Food Safety Authority (EFSA).

Key words: genus *Fusarium* molds, fumonisins, trichothecenes, zearalenone, food –borne diseases

## Brief overview:

**The *Fusarium* molds** are microscopic widespread filamentous fungi. They inhabit a variety of resources: plants, higher fungi, organic waste in the soil, including carcasses and use them in their vital activity as substrates thus participating in their decomposition but also can adapt to resources provided by human population and can become a treat.

Generally, molds form a mycelium, which is composed of many multicellular filaments (hyphae) and is considered as an organism, unlike yeast, which are unicellular. Molds reproduce themselves by spores - asexual (conidia) and sexual, with one or more nuclei. Like other fungi, molds do not photosynthesize but emit hydrolytic enzymes that degrade the substrate and absorb the resulting nutrients with their hyphae. These fungi prefer mostly humid and warm regions, but have adapted to almost every corner of our planet. These miniature organisms find particularly favorable living conditions in people's homes and especially in refrigerators and rooms with high humidity.

Molds can cause two groups of diseases: mycoses - by colonizing various tissues in the body and using them as a substrate and mycotoxicoses - poisonings by the products of their metabolism, which enter the food of humans and animals.

**Mycotic diseases** include various diseases: keratitis, endophthalmitis, septic arthritis, catheter infections, skin and subcutaneous mycoses, mycetomas and generalized tissue infections in immunocompromised patients with AIDS, diabetes, cancer, neutropenia, etc. The species *Fusarium solani* most commonly inhabits homes and is recognized as the cause of 4% of nasobronchial allergies in humans. These fungi emit substances and spores that cause allergic



symptoms, expressed in inflammation and tearing of the eyes, chronic cough, headache or migraine, shortness of breath, runny nose, frequent sneezing and sinusitis, rash, fatigue, etc.

**Mycotoxicoes** include diseases caused by fungal toxins. Fungi produce different metabolites in the course of their metabolism and reproduction, and depending on the species and quantity, can cause a number of adverse effects in humans and animals (Борисова, 2009, Todorova, 2015). Often a prerequisite for the synthesis of mycotoxins are the stressful conditions in which the fungi fall during abrupt climate change, at various agro-technical measures and others. For example, drought in early maize and sorghum growth, followed by cold and humid conditions during flowering and grain development, has been found to favor the synthesis of high levels of toxins from some mold strains (Борисова, 2009).

For centuries, diseases in humans and animals have been reported in the literature as a result of the consumption of food and feed contaminated with molds. Since now, a large number of mycotoxins produced by them have been isolated, some of which have very strong pathogenic effects, even can be fatal.

Mycotoxicoes in farm animals are disease of great economic importance worldwide. Annually, based on reduced productivity, reproductive disorders, infertility, reduced immune reactivity and increased mortality, huge losses to agriculture are caused. It is known that maize and wheat, as the main components in the production of feed for farm animals and food products, are often naturally infested with molds and under certain conditions their toxicity becomes dangerous to human and animal health. The concentration of mycotoxins above the maximum permissible levels for the species leads to the appearance of so-called "feed or food-borne" mycotoxicoes.

The most common causes of mold pollution of grains are the members of the genus *Fusarium*. These fungi are common in the soil and plants and were registered in both the southern and northern hemispheres. They are extremely adaptable to different climatic conditions. Most of them are harmless saprophytes, but some species can be pathogenic not only to insects and other fungi, but also to plants, thus causing diseases in humans and animals that consume them. The products of the most of these fungi are recognized as toxins, growth hormones or antibiotics. Some species are harmless saprobes, other as *Fusarium venenatum* have industrial application as a meat substitute and a source of mycoproteins in vegetarians.

The most common in nature of the representatives of the genus *Fusarium* are *F. graminearum*, *F. verticillioides* (*moniliforme*), *F. poae*, *F. equiseti*, *F. culmorum*, *F. sporotrichoides*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. solani* and others. They are spread in all climatic zones. In the field develop year-round - throughout the period of growth, vegetation and maturation of the plants, and the production of mycotoxins may continue during grain storage (Борисова, 2009). Predisposing factors for their development are high temperatures and humidity, errors in agronomic measures and crop storage, violation of grain integrity by pests and others. Because molds infect all parts of plants, their toxins can be found in a variety of foods intended for human and animal consumption. Natural infection with these molds is most often found in wheat, corn, rye, sorghum, millet, oats, rice, potatoes, watermelons, bananas, cucumbers, etc., in fruits and in their green plant parts used for fodder. The toxins in these products are extremely resistant to high temperatures, so they are not neutralized by heat treatment. In addition, mycotoxins are found in various vegetable fats and sauces, beer, cigarettes, etc.

Molds belonging to this genus produce three main groups of mycotoxins - fumonisins, trichothecenes and zearalenone.

**Fumonisin**s are the most recently discovered group of mycotoxins and as such arouse great interest among the scientific community. The first scientific description of the fungus, the main producer of fumonisins - *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*), dates from the late 19th century and was isolated and first studied by the team of Gelderblom in 1988 in South

Africa (Gelderblom et al., 1988), but its study continues and in more recent times. It has been found that fumonisins are also produced by other members of the genus *Fusarium* - *F. nygamai*, *F. anthophilum* and *F. proliferatum*. However, their toxic effects are currently being studied, not only because of the ubiquity of the fungi that produce them, but also because of their still unclear pathogenesis. The interest in these mycotoxins is provoked by the fact that their prevalence and high concentrations are highly correlated with cases of liver and esophageal cancer in humans, and are therefore considered to be foodborne carcinogen (Van Rensburg et al., 1985, 1990; Ueno et al., 1996, 1997). Another important point is their probable participation in the development of malformations in embryos and especially in the formation of neural tube defects (NTD) with a lethal effect. Exposure of pregnant women to high levels of fumonisins in South Africa, Central and South America, the United States (1989-91) and China is thought to be the cause of frequent cases of NTD in embryos.

The formation of toxins from molds depends on their genetic potential and the action of various predisposing factors. To date, the group of fumonisins includes about 30 compounds and their metabolites, which are classified into four main categories - FA, FB, FC and FP, according to the presence of a hydroxyl, methyl or amino group in their formula. Fumonisin B<sub>1</sub> has the highest toxicity and is 70–80% of the total fumonisin content found in food products (J. Gil-Serna et al., 2014), followed by fumonisin B<sub>2</sub>, and fumonisin B<sub>3</sub>. These mycotoxins mainly have nephrotoxic and hepatotoxic effects, but their effects on the nervous, cardiovascular and immune systems are not negligible (Kwon et al. 1995, 1997 a,b; Constable et al., 2000a, b; Todorova et al., 2014).

Acute fumonisin toxicosis in animals is characterized by rapidly developing muscle weakness, impaired respiration, cyanosis, coma and death within the first 12 hours. In horses and ponies, equine leukoencephalomyelitis (ELEM) is the most characteristic, which is expressed in liquefied necrotic lesions in the white matter of the cerebellum (Constable et al., 2000b). There is a lack of appetite, lethargy and uncontrolled head movements, followed by convulsions, ataxia and death after a few days. More in-depth studies have found that ELEM is a secondary result of the cardiovascular toxic effects of fumonisin B<sub>1</sub>. Pulmonary edema (PPE) is most common in pigs and is also thought to be provoked by cardiovascular toxicity of fumonisins and leads to dyspnea, cyanosis, weakness and death (Constable et al., 2000a).

Chronic intake of fumonisins is accompanied by a decrease or loss of appetite, poor digestion of feed, weight loss, gastrointestinal disorders, malaise, osteopathy and nephropathy. Changes in the biochemical parameters of the blood have been observed - a decrease in total protein, albumin and blood sugar and an increase in the levels of some enzymes: ASAT, ALAT, GGT, AP and LDH (Espada et al., 1994; Ledoux et al., 2003).

**Trichothecenes** are the other major group of mycotoxins found around 1940 in cereals (Freeman and Morrison, 1949). They are synthesized not only from molds of the genus *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. sporotrichoides*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. Equiseti*), but also from other genera of molds: *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium* and *Stachybotrys*. About 200 compounds were isolated, but only a few of them are found in foods: deoxynivalenol (DON, DON), nivalenol (NIV), diacetoscripenol (DAS), T 2, HT 2, neosolaniol and others.

In farm animals and humans, trichothecenes cause acute or chronic poisoning, and the most sensitive to them are the rapidly proliferating tissues in the affected organism - bone marrow and intestines. By impairing hematopoiesis, they lower the levels of coagulation factors and fibrinogen, have hemolytic and hypotensive effects. They also cause immunosuppression by damaging the bone marrow, spleen, thymus and lead to leukopenia. They act on the central nervous system and cause nausea, vomiting, anorexia, tremor, dizziness and lethargy.

Acute intoxication, anorexia, gastroenteritis, diarrhea, dyspnea, hypothermia, hypotension, tachycardia, tremor, seizures, coma and death have been reported after consumption of high



trichothecene levels. Reproductive function is also impaired, leading to abortions and damage to the fetus. Upon contact, they cause dermatitis, skin lesions, conjunctivitis and damage respiratory tract mucous membranes. In 1932, in the former USSR, their consumption by humans caused toxic alimentary allergy with 60% mortality. Trichothecenes are believed to have been used as chemical weapons in Afghanistan and Cambodia in the form of "yellow rain"(Desjardins, 2009). Diacetoxyscripenol (*F. poae*) and T2 are considered etiological factors of Kashin-Beck disease - bone deformities in humans and animals in endemic areas, where are low the environmental levels of the essential trace element selenium (Wu and Xu, 1987; <http://www.kbdfund.org/kashin-beck-disease.html>). These toxins cross the placenta and cause apoptosis in the fetus. Chronic intoxication with trichothecenes leads to growth retardation, cachexia, decreased productivity in animals, suppression of the immune system and increased susceptibility to infectious diseases. The mechanism of action of trichothecenes involves inhibition of DNA, RNA and protein synthesis at the ribosomal level, and lipid peroxidation in cell and mitochondrial membranes. Experimentally was found that they cause apoptosis in various cell types, through mitochondrial and non-mitochondrial mechanisms. After oral administration, they are absorbed and spread rapidly in the body. In 1986, Corley and his team found that 15-24% of the radiolabeled T2 toxin was found in the gastrointestinal tract just four hours after ingestion, and 4.7 to 5.2% of T2 accumulated in the muscles and liver (Corley et al., 1986). Excretion of trichothecenes, in addition to urine and faeces, occurs through milk and eggs, leading to the appearance of significant residues in these products.

**Zearalenone** is a nonsteroidal mycoestrogen that is synthesized by the fungi *F. graminearum* and *F. sporotrichoides* (Nakamura and Kadokawa, 2015). It is a resistant and thermo stable mycotoxin that has an affinity for  $\alpha$ - and  $\beta$ -estrogen receptors in various tissues and induce estrogenic effects in human cells via genomic mechanisms and subsequent diseases (Shier et al, 2001; Pazaiti et al., 2012). In females, zearalenone causes hyperestrogenism, nymphomania, abortion and false pregnancy, redness and swelling of the external genitalia and nipples, vaginal and rectal prolapse, increased secretion, which creates a favorable environment for the development of bacteria that cause vaginitis and mastitis, persistent estrus and sterility (Ito and Ohtsubo, 1994). This mycotoxin affects the formation of multiple follicular cysts of the ovaries as well as leads to atrophy of the latter. In male animals, it causes feminization, swelling of the nipples, testicles' atrophy and reduction of sperm production and serum testosterone concentrations (Yang et al., 2007). Pigs, sheep, cows and especially young animals are very sensitive and premature puberty can be observed. In laboratory animals, zearalenone has been shown to cause adenomas of the liver and pituitary gland, fibrosis of the uterus, mammary glands and bone marrow. There are studies that compare it with various phytoestrogens and find that it is one of the strongest estrogens found in nature.

In conclusion, the *Fusarium* molds are extremely sophisticated organisms that have conquered all places on the planet and have cultivated various adaptations for survival in nature, part of which is the synthesis of mycotoxins that can lead to diseases.

## References

Борисова, Л. Микологични и микотоксикологични проучвания на царевица и пшеница, произведени в България и някои актуални микотоксикози при продуктивни животни, Хабилизационен труд за получаване на научно звание „старши научен сътрудник I степен”, София, 2009.

Тодорова, К. Патоморфологични и имунологични проучвания при пилета, експериментално третиран с фузониин В<sub>1</sub>, дисертация, София, 2015.

- Constable, P.D., G.W. Smith, G.E. Rottinghaus, W.M. Haschek. Ingestion of fumonisin B<sub>1</sub>-containing culture material decreases cardiac contractility and mechanically efficiency in swine. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2000a, 162, 151–160.
- Constable, P.D., J.H. Foreman, A.L. Waggoner, G.W. Smith, R.M. Eppley, M.E. Tumbleson, W.M. Haschek. The mechanism of fumonisin in horses. Draft report on USDA-CSREES Grant#928-39453, 2000b, 1-28.
- Corley, R.A., S.P. Swanson, G.J. Gullo, L. Johnson, V.R. Beasley, W.B. Buck. Disposition of T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin in intramuscularly dosed swine. *J Agric Food Chem*, 1986, 34, 868-875.
- Desjardins, A.E. From yellow rain to green wheat: 25 years of trichothecene biosynthesis research. *J Agric Food Chem* 2009, 57, 4478–4484.
- Espada, Y., R. Ruiz de Gopegui, C. Cuadradas, F.J. Cabanes. Fumonisin mycotoxicosis in broilers. Weights and serum chemistry modifications. *Avian Disease*, 1994, 38, 454–460.
- Freeman, G.G. and RI Morrison. The isolation and chemical properties of trichothecin, an antifungal substance from *Trichothecium roseum* Link, *Biochem. J.* 1949, 44: 1.
- Gelderblom, W.C., K. Jaskiewicz, W.F. Marasas, P.G. Thiel, R.M. Horak, R. Vleggaar, N.P. Kriek. Fumonisin-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54 (7) 1806 – 1811.
- Gil-Serna, J., C. Vázquez, M.T González-Jaen, B Patiño. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), Mycotoxins. Toxicology*, 2014, 887-892.
- <http://www.kbdfund.org/kashin-beck-disease.html>- Kashin-Beck Disease Fund (KBDF)
- Ito, Y., K. Ohtsubo. Effects of neonatal administration of zearalenone on the reproductive physiology of female mice. *J Vet Med Sci.*, 1994, 56(6), 1155-1159.
- Kwon, O.S., J.A. Sandberg, W.J. Slikker. Effects of fumonisin B<sub>1</sub> treatment on blood-brain barrier transfer on developing rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 1997a, 19, 151–155.
- Kwon, O.S., L.C. Schmued, W.Jr. Slikker. Fumonisin B<sub>1</sub> in developing rats alters brain sphinganine levels and myelination. *Neurotoxicology*, 1997b, 18, 571–579.
- Kwon, O.S., L.C. Schmued, W.Jr. Slikker. Fumonisin FB<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) increases sphinganine ( a precursor of ceramide synthesis) in the brain and spinal cord of developing rats. *The Toxicologist*, 1995, 15, 17–20.
- Ledoux, D.R., J.N. Broomhea, A.J. Bermudez, G.E. Rottinghaus. Individual and combined effects of the *Fusarium* mycotoxins fumonisin B<sub>1</sub> and moniliformin in broiler chicks. *USA Avian Dis*, 2003, Oct-Dec, 47 (4) 1368-75.
- Nakamura, U. and H. Kadokawa. The nonsteroidal mycoestrogen zearalenone and its five metabolites suppress LH secretion from the bovine anterior pituitary cells via the estradiol receptor GPR30 in vitro. *Theriogenology*, 2015, 84(8), 1342-1349.
- Pazaiti, A., M. Kontos, I.S. Fentiman. ZEN and the art of breast health maintenance *Int J Clin Pract*, 2012, 66, 28-36.
- Shier, W.T., A.C. Shier, W. Xie, C.J. Mirocha. Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicon*, 2001, 39, 1435-1438.
- Todorova, K., P. Dimitrov, R. Toshkova, S. Lazarova, E. Gardeva, L. Yossifova, B. Andonova-Lilova, R. Milcheva, R. Russev. Influence of fumonisin B<sub>1</sub> and deoxynivalenol on

the immune system of chickens after application in quantities, naturally presented in fodders. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, 2014, 67(1), 139-144.

Ueno, Y., K. Iijima, S.D. Wang, Y. Sugiura, M. Sekijima, T. Tanaka, C. Chen, S.Z. Yu. Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: A 3-year study of corn harvested in Haimen, China by HPLC and ELISA. *Food Chem Toxicol*, 1997, 35, 1143–1150.

Ueno, Y., S. Nagata, T. Tsutsumi, A. Hasega, F. Watanabe, H. Park, G.C. Chen, G. Chen, S.Z. Yu. Detection of microcystins, a blue–green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis*, 1996, 17, 1317 – 1321.

Van Rensburg, S.J., E.S. Bradshaw, D. Bradshaw, E.F. Rose. Oesophageal cancer in Zululand, South Africa: A case control study. *Br J Cancer*, 1985, 51, 399–405.

Van Rensburg, S.J., G.C. Van Schalkwyk, D.J. Van Schalkwyk. Primary liver cancer and aflatoxin intake in Transkei. *J Environ Pathol Toxicol*, 1990, 10, 11–16.

Wu, J. and G.L. Xu. Plasma selenium content, platelet glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity of residents in Kashin-Beck disease affected area in China. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis*. 1987,1(1), 39-43.

Yang, J.Y., G.X. Wang, J.L. Liu, J.J. Fan, S. Cui. Toxic effects of zearalenone and its derivatives  $\alpha$ -zearalenol on male reproductive system in mice. *Reproductive Toxicology*, 2007, 24(3-4), 381-387.

# Cytotoxic effect of Lovastatin and Fluvastatin in retrovirus-transformed rat sarcoma cells

Milena Glavcheva<sup>1</sup>, Zdravka Petrova<sup>1</sup>, Rossen Spasov<sup>2</sup>, Radostina Alexandrova<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Experimental Morphology, Pathology and Anthropology with Museum,  
Bulgarian Academy of Sciences*

<sup>2</sup>*Medical Faculty, Sofia University "St Kliment Ohridski"*

\*Corresponding author

## Abstract

The aim of our study was to evaluate the influence of Lovastatin and Fluvastatin on viability and proliferation of cultured rat sarcoma cells transformed by Rous sarcoma virus strain Schmidt-Ruppin (LSR-SF-SR) that express *v-src* gene. The investigations were performed by short-term experiments (20-72h, with monolayer cell cultures) carried out by MTT test, neutral red uptake cytotoxicity assay, crystal violet staining, hematoxylin and eosin staining, double staining with acridine orange and propidium iodide and Annexin V/FITC analysis, as well as long-term experiments (14 days) with 3D cell colony-forming method. The results obtained reveal that applied at a concentration range of 1.56 – 200 µg/ml both statins decrease viability and proliferation of the treated cells in a time- and concentration dependent manner inducing cell pathological changes and apoptosis. Both compounds completely suppress 3D growth of sarcoma cells at concentrations  $\geq 100$  µg/ml (Fluvastatin) и  $\geq 200$  µg/ml (Lovastatin)

## Introduction

Involved widely in clinical practice at the beginning of 1990<sup>th</sup> as antihyperlipidemic drugs that decrease high levels of total and particularly of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors (known as Statins) are one of the most commonly used drugs throughout the world. In addition, these compounds affect a number of key physiological processes, including inflammation, nitric oxide synthesis, coagulation cascade, etc. It has been suggested that statins may be useful in the prevention / treatment of neurological diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and multiple sclerosis (Alexandrova et al., 2019). Something more, statins continue to attract the interest of biomedical community by their potential antitumor properties. They have been found to exhibit antineoplastic activity against wide variety of cell cultures and animal tumor models as well as the ability to potentiate the antitumor effects of some chemotherapeutics. There are data that statins reduce the survival and proliferative activity of cell lines derived from some of the most aggressive human tumors for which currently available therapeutic strategies are limited or insufficiently effective such as non-small cell lung cancer (Zhang et al., 2015), triple negative breast cancer (Shen et al., 2015, Kou et al., 2018), pancreatic cancer (Paškevičiūtė, Petrikaitė, 2017; Gong et al., 2017), osteosarcoma (Kany et al., 2018), and glioblastoma multiforme (Jiang et al., 2014; Bayat et al., 2016). For example, Lovastatin is reported to inhibit proliferation of MDA-MB-231 and MDA-MB-468 human breast cancer cells and induces apoptosis in MDA-MB-231 (Yang et al., 2016) under both normoxia and hypoxia. Other authors have reported for Lovastatin-induced apoptosis in subset of squamous cell carcinomas (Dimitroulakos et al., 2001). In their investigation Anantha Koteswararao Kanugula et al., observed cell death in MDA-MB-231 cells induced by Fluvastatin (synthetically derived one from mevalonolactone)

(Kanugula et al., 2014). Fluvastatin inhibits primary tumor growth and spontaneous metastasis in a mouse melanoma model (Tsubaki et al., 2015). Regulatory mechanisms of fluvastatin and lovastatin for the p21 (an inhibitor of cyclin-dependent kinase, that can function as an oncogene or tumor suppressor) induction in human cervical cancer HeLa cells have been discussed (Lin et al., 2019).

As clinically established drugs, statins, and in particular Fluvastatin and Lovastatin, have an advantage over the group of newly tested compounds referring to proven biocompatibility and well established pharmacokinetics. The elucidation of their antitumor potential and mechanism of action requires the accumulation and analysis of experimental data in a wide range of model systems. According to the literature available, the influence of statins on viability and proliferation of retrovirus-induced tumor cells is not clarified.

The aim of our study was to evaluate the cytotoxic effect of Lovastatin and Fluvastatin on viability and proliferation of cultured rat sarcoma cells transformed by Rous sarcoma virus strain Schmidt-Ruppin (LSR-SF-SR) that express *v-src* gene.

## Materials and Methods

### *Consumables*

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Gibco-Invitrogen (UK). Lovastatin, Fluvastatin, dimethyl sulfoxide (DMSO), neutral red, crystal violet, acridine orange, propidium iodide, and trypsin were obtained from AppliChem (Germany); thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) and purified agar were from Sigma Aldrich Chemie GmbH (Germany). Antibiotics (penicillin and streptomycin) for cell culturing were from Lonza (Belgium). Mayer's haematoxylin and eosine were from Leica (UK). All other chemicals of the highest purity commercially available were purchased from local agents and distributors. Santa Cruz Biotechnology Annexin V detection Santa Cruz kit (USA) was used for the identification of cell death. All sterile plastic and syringe filters were from Orange Scientific (Belgium).

### *Cell cultures and cultivation*

Permanent cell line LSR-SF-SR established from a transplantable sarcoma in rat, induced by *Rous sarcoma virus strain Schmidt-Ruppin*, was used as a model system in our investigations. The cells were routinely grown as monolayer cultures in D-MEM medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin, and maintained at 37°C in humidified CO<sub>2</sub> incubator (Thermo scientific, Hepa class 100). For passages the cells were detached using a mixture of 0.05% trypsin and 0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

### *Cytotoxicity assays*

Lovastatin and Fluvastatin were dissolved in DMSO and then diluted in culture medium. The final concentration of DMSO in stock solutions of the compounds tested (where the concentration of the compound was 1 mg/ml) was 2 % of the total volume.

The cells were seeded in 96-well flat-bottomed microplates for cell culturing at a concentration of  $1 \times 10^4$  cells/well. After the cells were grown for 24 h to a sub-confluent state (~ 70%), the culture medium was removed and changed by media modified with different concentrations (0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 and 200 µg/ml) of the examined compounds. Each concentration was applied into 4 to 8 wells. Samples of cells grown in non-modified medium served as controls. After 24, 48 and 72 h of incubation, the effect of the compounds on cell viability and proliferation was examined by thiazolyl blue tetrazolium

bromide (MTT) test, crystal violet staining (CV) and neutral red uptake cytotoxicity (NR) assays.

The MTT colorimetric assay of cell survival was performed as described by Mossman (1983). The method consisted of three hours incubation with MTT solution (5 mg MTT in 10 mL D-MEM) at 37°C under 5% carbon dioxide and 95% air, followed by extraction with a mixture of absolute ethanol and DMSO (1:1, vol/vol) to dissolve the blue formazan.

The NR assay was based on the method of Borenfreund and Puerner (1985). To each well containing corresponding cells a medium consisting of NR (50 µg/mL, 0.1 mL) was added. The plate was placed in the CO<sub>2</sub> incubator for 3 h for the uptake of vital dye. Thereafter, the medium with NR was removed and the cells were washed with phosphate saline buffer (PBS, pH 7.2-7.4, 0.2 mL/well), followed by the addition of 0.1 mL 1% acetic acid solution containing 50% ethanol to extract the dye from the cells.

After removal of the culture media from the wells, 100 µl solution of 1.5 g crystal violet with 225 ml distilled H<sub>2</sub>O and 75 ml methyl alcohol was added to each one of the wells in the 96-well plate. Cells were incubated for 10 min at a room temperature and the color agent was carefully removed in water followed by drying for 24 h at room conditions. After the 24- hour incubation an extracting solution composed of 29.41 g sodium citrate in 500 ml bi-distilled water and 500 ml 96% ethyl alcohol was added to the each well for a period of 30 min.

All of measurements (MTT, NR, CV) were preceded by a 10 min shaking (Titertek shake machine, Flow Laboratories) of the plates. Extinction measurement was conducted by ELISA automatic microplate reader (TECAN, Sunrise™, Grodig/Salzburg, Austria) at wavelength of 540/620 nm optical density for MTT test and CV assays, and at 540 nm for NR assay. Relative cell viability, expressed as a percentage of the untreated control (100% viability), was calculated for each concentration. Concentration–response curves were prepared and the effective cytotoxic concentration of the compounds CC<sub>50</sub> (µg/ml) and CC<sub>90</sub> (µg/ml) causing respectively 50% and 90% reduction of cell viability, was estimated from these curves. All data points represent an average of three independent assays.

### ***Methods for examination of cytopathological changes and identification of cell death***

The ability of the compounds to induce cytopathological changes and the identification of cell death were performed by hematoxylin and eosin staining (H&E), double staining with acridine orange and propidium iodide and Annexin V / FITC analysis. The cells were grown on sterile cover slips (3.0 - 3.5 x 10<sup>5</sup> cells/well) in 6-well plates in the presence of the compounds tested. Non-treated cells served as controls (Cell culture control). After 20 h of incubation, the cover slips were removed and the corresponding method was performed as described below:

- ***Hematoxylin and Eosin staining (H&E)***

The cover slips were washed with PBS, fixed in methanol (2 x 15 minutes) and stained with hematoxylin and eosin in a standard procedure. The microscopic preparations were examined under light microscope (Leica DM 5000B, Wetzlar, Germany).

- ***Double staining with acridine orange (AO) and propidium iodide (PI)***

The cover slips were removed and washed with PBS for 2 min. Equal volumes of fluorescent dyes containing AO (10 µg/mL in PBS) and PI (10 µg/mL in bidistilled water) were added to the cells. Fresh stained cells were placed on a glass slide and explored under fluorescence microscope (Leica DM 5000B, Wetzlar, Germany) within 30 min. before the fluorescent color started to fade.

- ***Annexin V / FITC binding assay***

The investigations were performed by Santa Cruz Biotechnology Annexin V detection Santa Cruz kit (USA) according to the manufacturer's instructions. Fresh stained cells were placed



on a glass slide and explored under fluorescence microscope (Leica DM 5000B., Wetzlar, Germany) within 30 min. before the fluorescent color started to fade.

A protein kinase inhibitor Staurosporine was used as a positive control as an apoptosis inducing agent in concentration 1  $\mu$ M for 4 hours to induce DNA fragmentation and apoptosis in positive control in AO/PI and Annexin V/FITC assays.

### ***3D Colony forming method***

Tumor cells ( $10^3$  cells/well) suspended in 0.45% purified agar with D-MEM medium containing different concentrations of the compounds examined (0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 and 200  $\mu$ g/ml) and corresponding amount of DMSO as well as culture medium control were layered in 24 well microplates. The presence/absence of colonies was registered using an inverted microscope (Carl Zeiss, Germany) during period of 14 days. Colony inhibitory concentration (CIC,  $\mu$ M) at which the compounds tested inhibit completely the ability of tumor cells to grow in a semi-solid medium was determined. The number of 3D-colonies was counted in 3-5 independent fields for each compound/concentration.

### ***Statistical analysis***

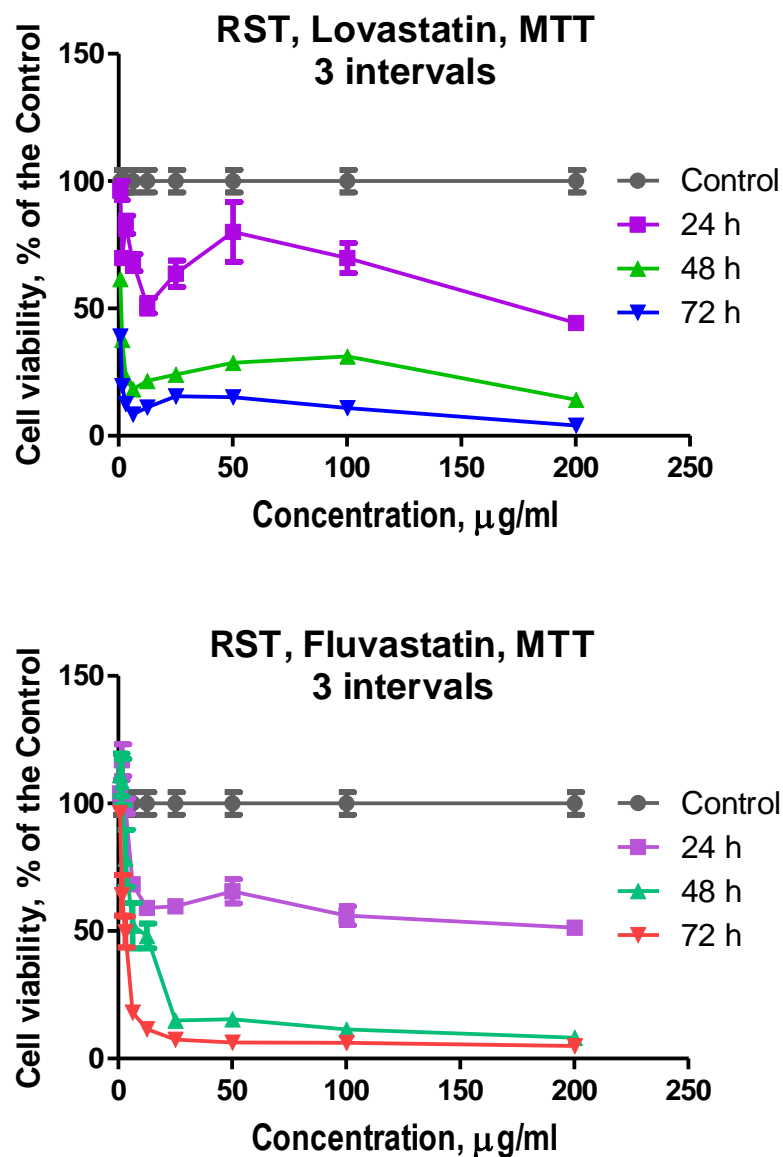
The data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean. Statistical differences between control and treated groups were assessed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett post-hoc test and Origin 6.1<sup>TM</sup>.

## **Results and Discussion**

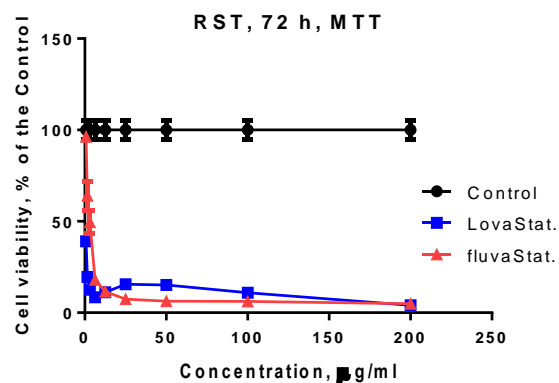
### ***Short-term experiments***

#### **Cytotoxicity assays**

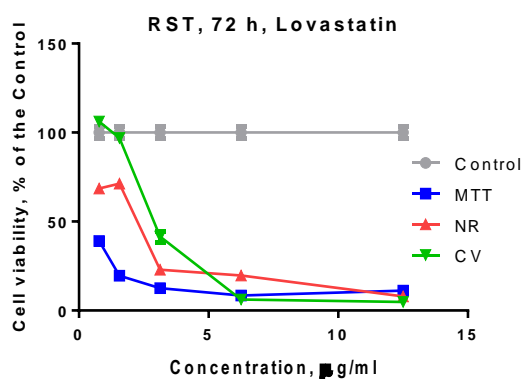
The investigations were performed by MTT test known the gold standard among cytotoxicity assays, neutral red uptake cytotoxicity assay and crystal violet staining. The compounds were applied at a concentration range of 0.78 5-200  $\mu$ g/mL for 24, 48 and 72 h and significantly reduced the percent of viable cells as compared to the untreated control. Concentration-response curves were prepared on the basis of experimental data obtained (Fig. 1 and 2). Cytotoxic concentrations 50 (CC<sub>50</sub>) and 90 (CC<sub>90</sub>) calculated where possible from these curves were presented in Table 1.



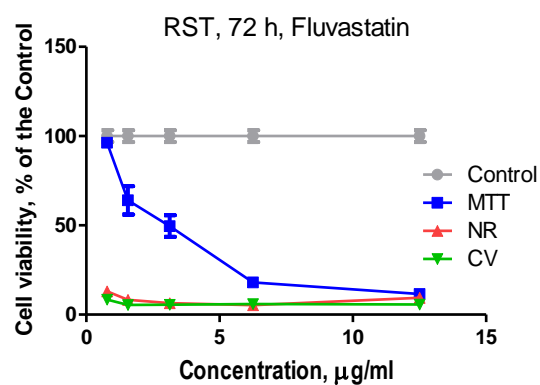
**Fig. 1.** Effect of lovastatin and fluvastatin on viability and proliferation of LSR-SF-SF rat sarcoma cells. The compounds were applied at a concentration range of 0.75 -200  $\mu\text{g/ml}$  for 24, 48 and 72h. Cell viability was determined by MTT test.



A.



B.



C.

**Fig.2.** Effect of lovastatin and fluvastatin on viability and proliferation of LSR-SF-SF rat sarcoma cells. The compounds were applied for 72 h at a concentration range of 0.75-200  $\mu\text{g/ml}$  (A) and 1.56-12.5  $\mu\text{g/ml}$  (B, C). Cell viability was determined by MTT test (A) and MTT test (MTT), neutral red uptake cytotoxicity assay (NR) and crystal violet staining (CV).

**Table 1. Cytotoxic activity (CC<sub>50</sub> and CC<sub>90</sub>) of statins (Lovastatin, Fluvastatin) in LSR-SF-SR rat sarcoma cells**

Compound	Treatment interval, h	MTT	NR	CV
Lovastatin	24	178.1 -	-	-
	48	1.16 -	-	-
	72	- (185.8)	2.25 (11.52)	2.89 (5.91)
Fluvastatin	24	-	-	-
	48	9.51 (143.6)	-	-
	72	3.01 (17.24)	- (1.43)	-

MTT = MTT test; NR = Neutral red uptake cytotoxicity assay; CV = crystal violet staining; \*CC<sub>50</sub> and \*\*CC<sub>90</sub> (in brackets) - concentrations (µg / ml) at which the percentage of living cells decrease by 50% and 90%, respectively, compared to the untreated control; (-) indicates the cases in which CC<sub>50</sub> / CC<sub>90</sub> were not determined.

### **Cytopathological changes**

The cytopathological changes in rat sarcoma cells cultured for 20 h in the presence of 0.75 µg/mL and 1.56 µg/mL Lovastatin and Fluvastatin visualized by HE and AO/PI are presented in Fig. 3 and 4, respectively.

### ***Hematoxylin and Eosin staining H&E***

Visualization of morphology changes caused by treating with 0.78 µg/ml Lovastatin after **H&E** staining revealed polymorphic and about 70% vital cells. The rest of them had a swollen and strong vacuolated cytoplasm. A presence of giant multinucleated cells was observed. (Fig. 3c). Cultivated in the presence of 1.56 µg/ml Lovastatin LSR-SF-SR cultures formed chain structures of vital rounded cells, whose nuclei fills their volume. Non-vital cells were enlarged and polygonal in shape (Fig. 3e).

Cells treated by 0.78 µg/ml Fluvastatin were rounded and their nuclei occupy almost entirely the cell volume. Presence of cells in advanced apoptosis was observed (Fig. 3e). HE staining in images of samples treated with 1.56 µg/ml Fluvastatin evidences for an absence of mitotic activity and revealed single cells with formed apoptotic bodies. Round cells with pyknotic nuclei and groups of cells with edematous cytoplasm are observed. Single cells with formed apoptotic bodies (Fig. 3f).

After 20 h of cultivation the control of untreated LSR-SF-SR cells remained homogeneous in shape and size with predominance of rounded cells, but spindle-shaped drains was also observed (Fig. 3a). Cells in the positive control (Staurosporin) were predominantly in advanced form of apoptosis (Fig. 3f).

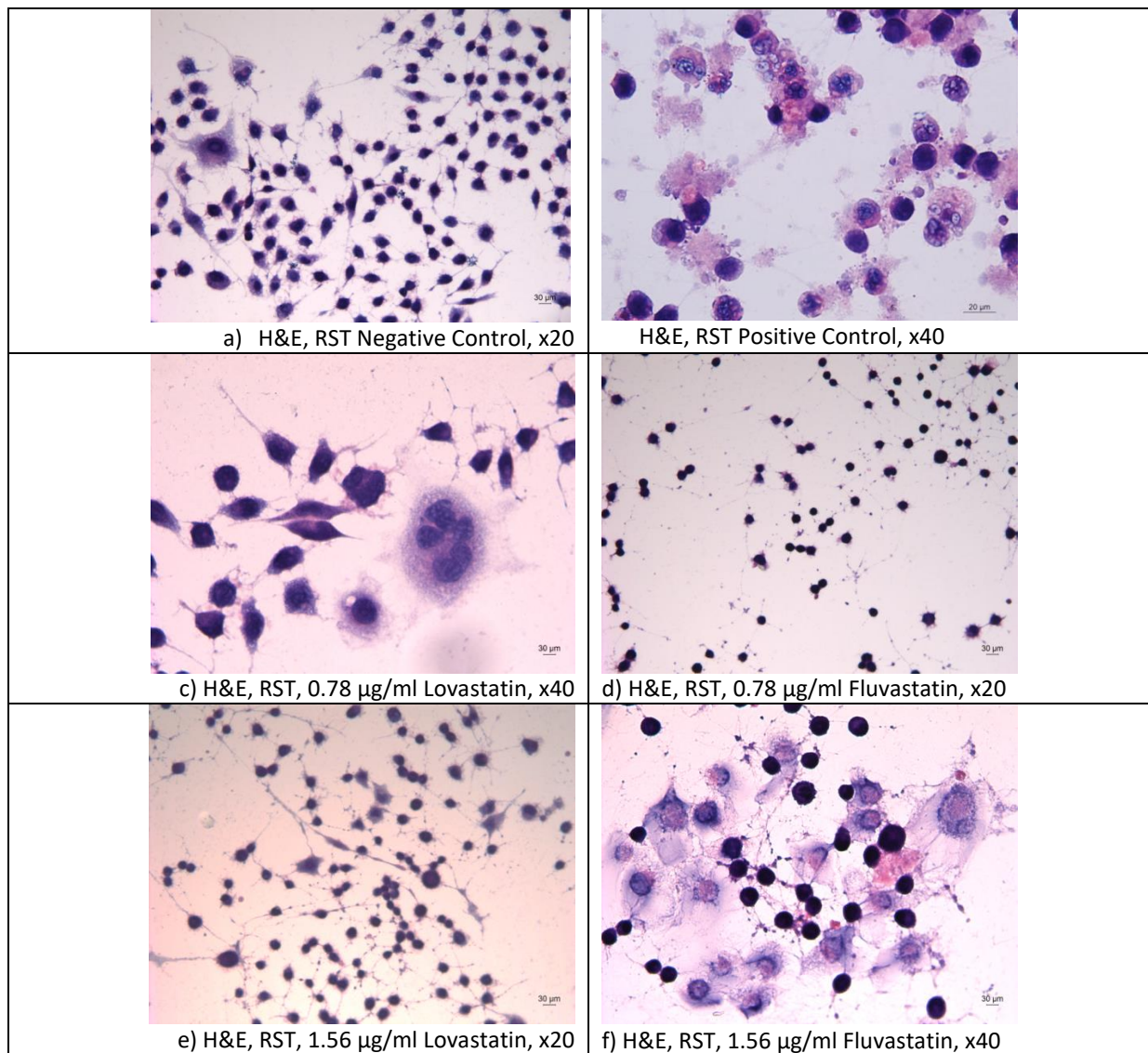
### ***Acridine orange (AO) and propidium iodide (PI)***

It was shown that in LSR-SF-SR cultured treated for 20 h in the presence of 0.78 µg/ml Fluvastatin predominate monomorphic vital cells and no significant difference was observed with cells under the effect of Lovastatin at the same concentration). Approximately a quarter of the cells had impaired cell membrane integrity and the cytoplasm was marked by PI with preserved nuclear integrity. Single giant multinucleated cells were also observed (Fig. 4c, d).

At concentrations of 1.56 µg/ml Lovastatin and Fluvastatin were presented with about half monomorphic vital cells. The remaining cells were strongly ballooned (with greatly increased cytoplasmic volume) with erased nuclear membranes with predominance of vital cells. The nuclear cytoplasmic index was significantly shifted in favor of nuclei that are activated with highly fragmented chromatin. Almost half of the treated cells were in various mitotic stages, expressing mitotic activity. Solitary non-vital cells were observed as well as cells expressing signs of advanced apoptosis with formed apoptotic bodies (Fig. 4e, f). Cell culture control was composed of vital monomorphic cells with moderate mitotic activity (Fig. 4a). A large number of cells in highly advanced apoptosis were observed in the Staurosporine treated control (Fig. 4b).

#### **Annexin V binding assay**

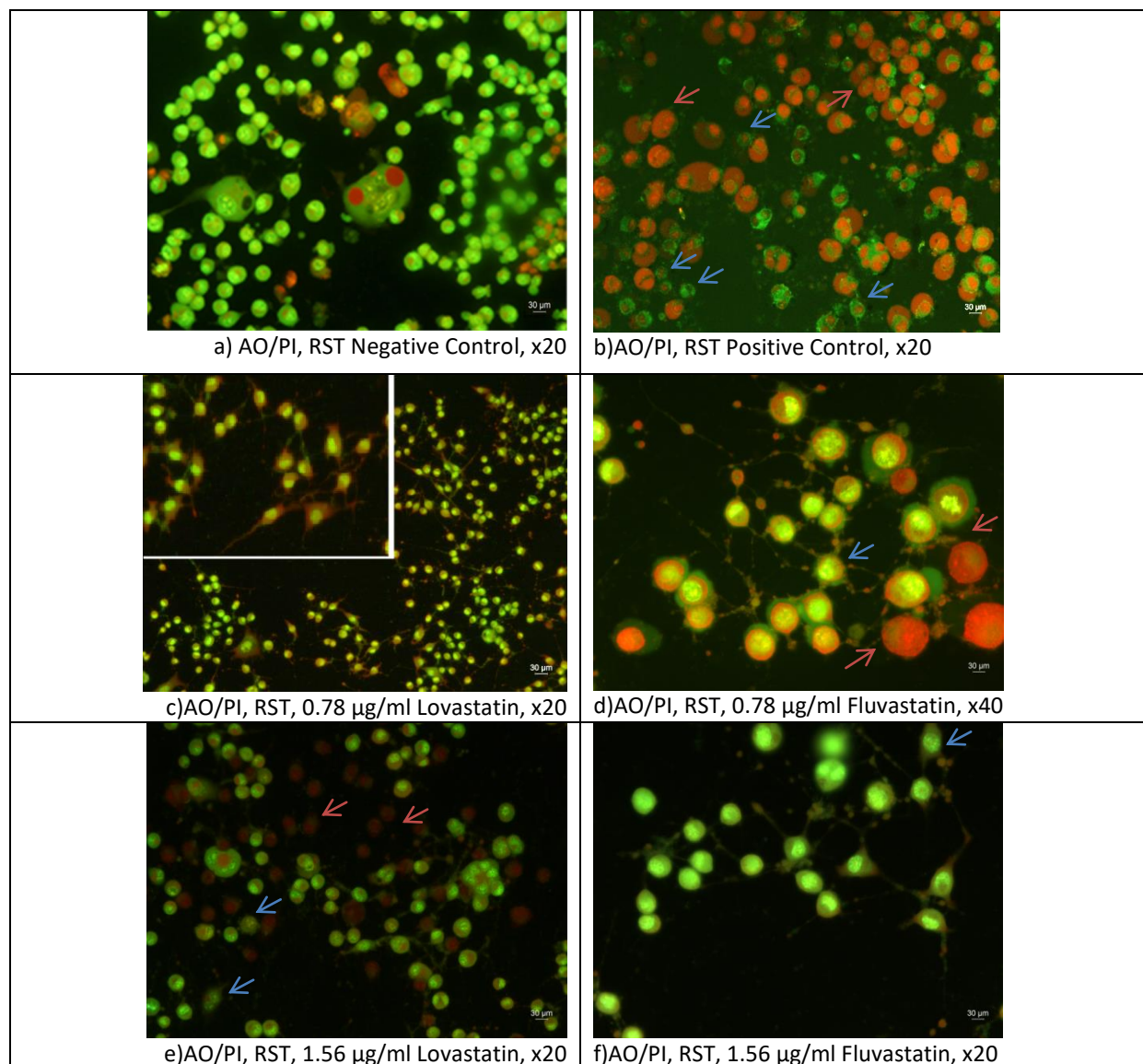
Cells incubated under Lovastatin concentration of 0.78 µg/ml showed predominantly cytoplasmic localization of Annexin V in difference with those treated with concentration of 1.56 µg/ml where the localization of Annexin V remains in membranes (Fig. 5c, e). Last one (Membrane localisation of Annexin V) is a definitive characteristic of an early stage apoptosis. Giant cells were observed at fluvastatin concentrations of 0.78 µg/ml and strongly ballooned ones (highly enlarged in volume cells) at concentrations 1.56 µg/ml (Fig. 5d, f). Negative control of Annexin V was composed of homogeneous cells with normal morphology with no fluorescent signal to react with Annexin V (Fig. 5a). Positive control showed expected apoptosis that was in advanced phase (Fig. 5b).



**Fig. 3. Hematoxilin & Eosin staining, LSR-SF-SR rat sarcoma cells**

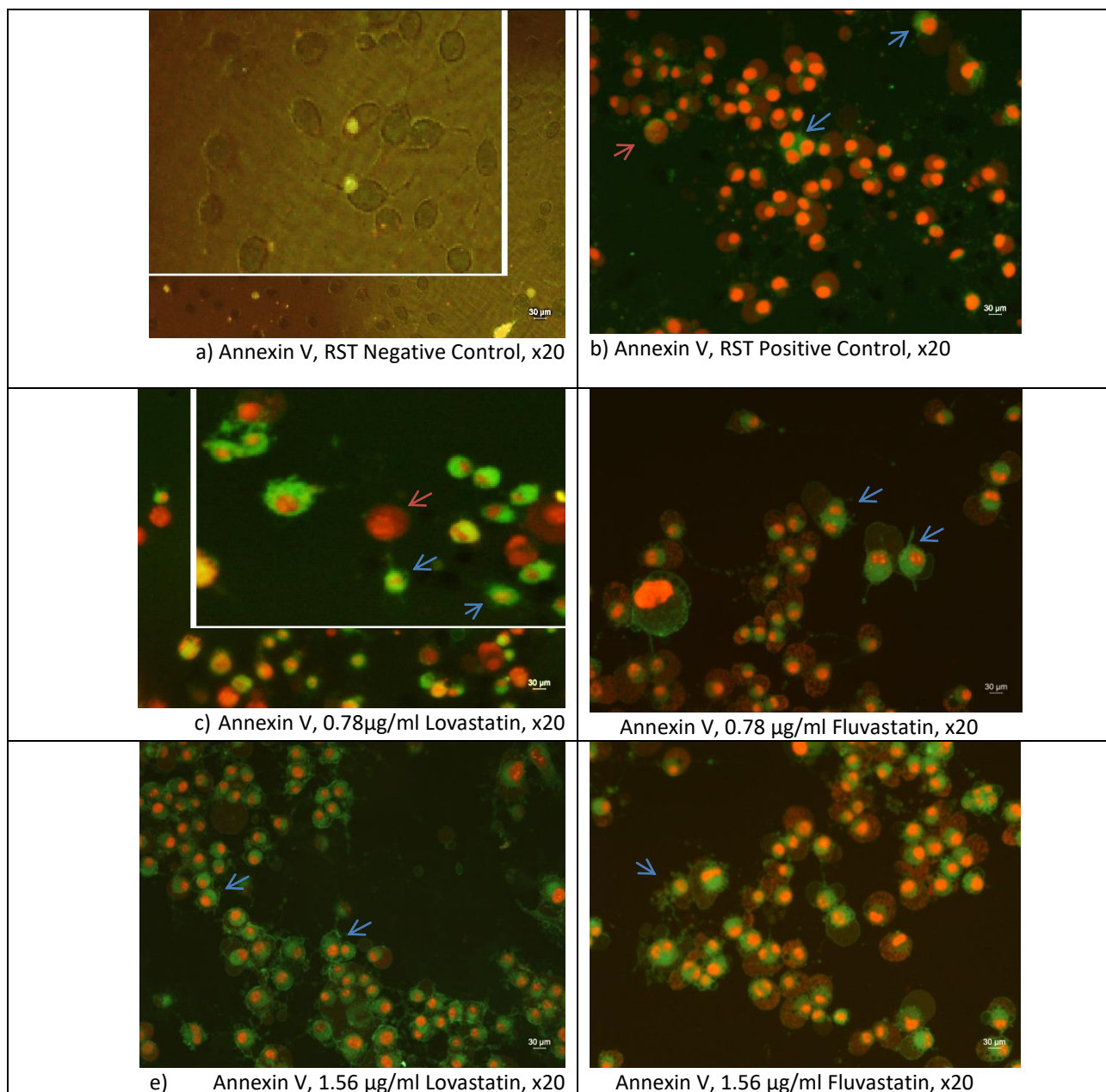
- a) Cell culture control; b) Positive control – cells cultivated for 4 h in presence of 1 µM Staurosporin; Rat sarcoma cells treated for 20 h by: c) 0.78 µg/ml Lovastatin; d) 0.78 µg/ml Fluvastatin; e) 1.56 µg/ml Lovastatin; f) 1.56 µg/ml Fluvastatin.





**Fig. 4. Double staining with acridine orange and propidium iodide double staining, LSR-SF-SR rat sarcoma cells**

a) Cell Culture control; b) Positive control – cells cultivated for 4 h in presence of 1 µM Staurosporin; Rat sarcoma cells treated for 20 h by: c) 0.78 µg/ml Lovastatin; d) 0.78 µg/ml Fluvastatin; e) 1.56 µg/ml Lovastatin; f) 1.56 µg/ml Fluvastatin. Early to advanced apoptosis observed is marked with blue arrows; necrosis is indicated by red arrows.



**Fig. 5. Annexin V, LSR-SF-SR rat sarcoma cells**

a) Cell culture control; b) Positive control – cells cultivated for 4 h in presence of 1 µM Staurosporin; Rat sarcoma cells treated for 20 h by: c) 0.78 µg/ml Lovastatin; d) 0.78 µg/ml Fluvastatin; e) 1.56 µg/ml Lovastatin; f) 1.56 µg/ml Fluvastatin. Early to advanced apoptosis observed is marked with blue arrows; necrosis is indicated by red arrows. Early to advanced apoptosis observed is marked with blue arrows; necrosis is indicated by red arrows.

### ***Long-term experiments (3D colonies in semi-solid medium)***

The long-term experiments lasting 14 days demonstrated that administered at concentrations  $\geq 200 \mu\text{g/mL}$  (Lovastatin) and  $\geq 100 \mu\text{g/mL}$  (Fluvastatin) both compounds completely suppressed 3D growth of rat sarcoma cells in a semi-solid medium.

The anticancer properties of statins were reported for the first time in early 1990s. Up to now there are data demonstrating the antiproliferative activity of these compounds and their ability to induce apoptosis in various tumor cell culture systems (including cell lines established from cancers of the lungs, breast, pancreas, prostate, uterine cervix as well as glioblastoma multiforme and osteosarcoma) and animal models (Chan et al., 2003; Vallianou et al., 2014, Alexandrova et al., 2019).

In this study we present for the first time information about ability of Lovastatin and Fluvastatin to reduce significantly viability and 2D/3D growth of retrovirus-transformed rat sarcoma cells expressing v-src oncogene. The members of src protooncogene family of nonreceptor protein tyrosine kinases perform important roles in cell proliferation, adhesion, migration, and survival and their expression / function has been found to be dysregulated in many types of human and animal cancers. It is not surprising that Src has been identified as a promising player in targeted antitumor treatment strategies (Zhang, Yu, 2014; Roskoski Jr, 2015).

The mechanism of antitumor potential of statins can be at least partially explained by following their characteristics / actions: i) induction of cell cycle arrest in the phase G1-S which leads to synchronization of tumor cells and increases their sensitivity to the cytotoxic effect of ionizing radiation; ii) influencing the Bcl-2 family rheostat decreasing expression of the antiapoptotic protein Bcl-2 and increasing the expression of the proapoptotic protein Bax; iii) anti-angiogenic effects iv) downregulation of some enzymes that are involved in tumor progression and metastasis such as matrix metalloproteinase – 2 (MMP-2); v) involvement in epigenetic control in cancer cells, etc. (Chan et al., 2003; Vallianou et al., 2014; Alexandrova et al., 2019). Lovastatin has been associated with altered epithelial-to-mesenchymal-transition-related protein expression (Huang et al., 2018). The chemo-sensitizing (Shojaei et al., 2018; Palko –Łabuz et al., 2019) and radio-sensitizing (Lee et al., 2018) properties of statins have been established as well as their ability to act additively or synergistically with some clinically available antitumor agents such as 5-fluorouracil and doxorubicin (Chan et al., 2003).

Studies on the antitumor activity of statins should continue for at least three reasons: i) There is evidence that they reduce the survival and growth of cell lines derived from common, aggressive and socially significant tumors in humans - the results of treatment in these patients are extremely unsatisfactory; ii) The so-called drug repurposing - a promising strategy in which drugs that are well known (in terms of their toxicological profile, pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics) and used for years in clinical practice are redirected to the needs of oncology (if they have a proven antitumor effect). This approach significantly reduces the time required to develop new drugs, saves labor and financial costs; iii) While antitumor activity of statins is widely reported in preclinical studies, the data on their anticancer efficacy in humans is controversial (Lee et al., 2009; Chan et al., 2003; Vallianou et al., 2014; Chae et al., 2015; Zhong et al., 2015; Jang et al., 2018). Additional studies, including in vitro and in vivo investigations and clinical trials are needed to elucidate better the antitumor potential of statins, their cellular and molecular targets and mechanism(s) of action, to identify the range of cancers that could be influenced by them, to select the most appropriate patients, to establish, application regimens.

## Conclusion

Our study presents original data on promising cytotoxic effect of two commercially available statins (Lovastatin and Fluvastatin) in retrovirus-transformed LSR-SF-SR rat sarcoma cells. The results obtained are a step forward in better clarification of the potential antitumor properties of statins and their possible application as repurposed drugs in clinical oncology. The provided Information on the “relationship” between statins and cells expressing the src gene will support the development of innovative anticancer therapeutic strategies.

**Acknowledgements:** This study was partially supported by Grant ДКОСТ 01/10 from 22.10.2018, National Science Fund, Bulgarian Ministry of Education and Science.

## References

- Alexandrova, R., D. Dinev, M. Glavcheva, J. Danova, G. Yetik-Anacak et al. Briefly about Anticancer Properties of Statins. *Biomed J Sci & Tech Res*, 2019, 17(2), MS.ID.002975.
- Bayat, N., S. Ebrahimi-Barough, A. Norouzi-Javidan, H. Saberi, R. Tajerian, et al. Apoptotic effect of atorvastatin in glioblastoma spheroids tumor cultured in fibrin gel. *Biomed Pharmacother*. 2016, 84, 1959-1966.
- Borenfreund, E. and J. Puerner. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* 1985, 24, 119-124.
- Chae, Y.K., M. Yousaf, M.K. Malecek, B. Carneiro, S. Chandra et al. Statins as anti-cancer therapy; Can we translate preclinical and epidemiologic data into clinical benefit? *Discov Med*, 2015, 20(112), 413-427.
- Chan, K.K., A.M. Oza, L.L. Siu. The statins as anticancer agents. *Clin Cancer Res*. 2003, 9(1), 10-19.
- Dimitroulakos, J., L.Y. Ye, M. Benzaquen, M.J. Moore, S. Kamel-Reid, M.H. Freedman et al. Differential sensitivity of various pediatric cancers and squamous cell carcinomas to lovastatin-induced apoptosis: therapeutic implications. *Clin Cancer Res*. 2001, 7, 158–67.
- Gong, J., E. Sachdev, L.A. Robbins, E. Lin, A.E. Hendifar, M.M. Mita. Statins and pancreatic cancer. *Oncol Lett.*, 2017, 13(3), 1035-1040.
- Huang, Y., J. Zhang, H. Shao, J. Liu, M. Jin et al. miR-33a Mediates the Anti-Tumor Effect of Lovastatin in Osteosarcoma by Targeting CYR61. *Cell Physiol Biochem*. 2018, 51(2), 938-948.
- Jang, H.J., H.S. Kim, J.H Kim, J. Lee. The Effect of Statin Added to Systemic Anticancer Therapy: A Meta-Analysis of Randomized, Controlled Trials. *J Clin Med*, 2018, 7(10). pii: E325. doi: 10.3390/jcm7100325.
- Jiang, P., R. Mukthavaram, Y. Chao, N. Nomura, I.S. Bharati et al. In vitro and in vivo anticancer effects of mevalonate pathway modulation on human cancer cells. *Br J Cancer*, 2014, 111(8), 1562-1571.
- Kanugula, A.K., V.M. Dhople, U. Völker, R. Ummanni, S. Kotamraju. Fluvastatin mediated breast cancer cell death: a proteomic approach to identify differentially regulated proteins in MDA-MB-231 cells. *PLoS One*, 2014, 9(9), e108890.
- Kany, S., M. Woschek, N. Kneip, R. Sturm, M. Kalbitz et al. Simvastatin exerts anticancer effects in osteosarcoma cell lines via geranylgeranylation and c-Jun activation. *Int J Oncol*, 2018, 52(4), 1285-1294.

- Kou, X., X. Jiang, H. Liu, X. Wang, F. Sun et al. Simvastatin functions as a heat shock protein 90 inhibitor against triple-negative breast cancer. *Cancer Sci*, 2018, 109(10), 3272-3284.
- Lee, J., K.H. Jung, Y.S. Park, J.B. Ahn, S.J. Shin et al. Simvastatin plus irinotecan, 5-fluorouracil, and leucovorin (FOLFIRI) as first-line chemotherapy in metastatic colorectal patients: A multicenter phase II study. *Cancer Chemother. Pharmacol*, 2009, 64, 657–663.
- Lee, J.Y., M.S. Kim, J.E. Ju, M.S. Lee, N. Chung, Y.K. Jeong. Simvastatin enhances the radiosensitivity of p53-deficient cells via inhibition of mouse double minute 2 homolog. *Int J Oncol*, 2018, 52(1), 211-218.
- Lin, C.K., S.T. Liu, C.C. Chang, S.M. Huang. Regulatory mechanisms of fluvastatin and lovastatin for the p21 induction in human cervical cancer HeLa cells. *PLoS One*, 2019, 14(4), e0214408.
- Mossman, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods*, 1983, 65, 55-63.
- Palko-Łabuz, A., K. Środa-Pomianek, O. Wesołowska, E. Kostrzewa-Susłow, A. Uryga, K. Michalak. MDR reversal and pro-apoptotic effects of statins and statins combined with flavonoids in colon cancer cells. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109, 1511-1522.
- Paškevičiūtė, M. and V. Petrikaitė. Differences of statin activity in 2D and 3D pancreatic cancer cell cultures. *Drug Des Devel Ther*, 2017, 11, 3273-3280.
- Roskoski, R. Jr. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacological Research*, 2015, 94, 9-25.
- Shen, Y.Y., Y. Yuan, Y.Y. Du, Y.Y. Pan. Molecular mechanism underlying the anticancer effect of simvastatin on MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Mol Med Rep*, 2015, 12(1), 623-630.
- Shojaei, S., J. Alizadeh, J. Thliveris, N. Koleini, E. Kardami et al. Statins: a new approach to combat temozolomide chemoresistance in glioblastoma. *J Investig Med*, 2018, 66(8), 1083-1087.
- Tsubaki, M., T. Takeda, T. Kino et al. Statins improve survival by inhibiting spontaneous metastasis and tumor growth in a mouse melanoma model. *Am J Cancer Res.*, 2015, 5(10), 3186-3197.
- Vallianou, N.G., A. Kostantinou, M. Kougias, C. Kazazis. Statins and cancer. *Anticancer Agents Med Chem*, 2014, 14(5), 706-712.
- Yang, T., H. Yao, G. He, L. Song, N. Liu, Y. Wang, Y. Yang, E. T. Keller, X. Deng. Effects of Lovastatin on MDA-MB-231 Breast Cancer Cells: An Antibody Microarray Analysis. *Journal of Cancer*, 2016, 7(2), 192–199.
- Zhang, S. and D. Yu. Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: turning promise into triumph. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2012, 33(3), 122-128.
- Zhang, X., Y. Teng, F. Yang, M. Wang, X. Hong et al. MCM2 is a therapeutic target of lovastatin in human non-small cell lung carcinomas. *Oncol Rep*, 2015, 33(5), 2599-2605.
- Zhong, S., X. Zhang, L. Chen, T. Ma, J. Tang, J. Zhao. Statin use and mortality in cancer patients: Systematic review and meta-analysis of observational studies. *Cancer Treat Rev*, 2015, 41, 554–567.

## Биологична активност на мед

Десислав Динев, Абдулкадир Абудаллах, Радостина Александрова

<sup>1</sup>*Институт по експериментална морфология патология и антропология с музей –  
БАН, София, България*

### Резюме

След цинка и желязото, медта е третият най-разпространен микроелемент в организма. Медта е благороден метал, подобно на среброто и златото. Полезните ѝ индустриални свойства включват висока топло- и електрическа проводимост, ниска корозия, легираща способност и ковкост. По-голямата част от металната мед намира приложение в електрониката. Човек си набавя мед чрез храната и усвояването е около 65–70% в зависимост от различни фактори, включително химичната форма, взаимодействие с други метали и хранителни компоненти. Според СЗО препоръчителният дневен прием на мед при възрастни е 900 микрограма.

Металът участва в изпълнението на редица физиологични процеси, сред които ангиогенеза, неврохуморална хомеостаза, регулиране на генната експресия, развитие на мозъка, пигментация и функциониране на имунната система, елементът има важно значение за синтезирането на хем и абсорбцията на желязо. Почти две трети от медта в тялото се натрупва в скелета и мускулите. Хронична токсичност на мед се наблюдава рядко и засяга предимно черния дроб. Познати са наследствени дефекти в метаболизма на този елемент, примери за което са болестите на Уилсън и Менкес.

### Исторически данни

Медта е използвана за първи път (около 8000 г. пр. н.е.) като заместител на камъка от хората през неолита (новата каменна ера). Металургията се появява в Месопотамия (около 4000 г. пр.н.е.), когато медта се е обработвала във форма на различни оръдия на труда, Месопотамците заедно с Египтяните, преди 4000 години са комбинирали мед и калай в бронз. Римляните се снабдявали с мед почти изцяло от остров Кипър. Металът е бил известен като aes Cyprium, „металът на Кипър“, съкратен до cuprium и по-късно редуциран до Cuprum (<https://www.britannica.com/science/copper>).

### Химия

Медта (Cu), химичен елемент - червеникав, изключително пластичен метал от група 11 (b) на периодичната таблица, който е необичайно добър проводник на електричество и топлина. В природата се намира в свободно метално състояние. Медта заема 29<sup>то</sup> място в таблицата на Менделеев, а атомната ѝ маса е 63.546. Металът се среща в три степени на окисление – Cu0, Cu1+ Cu2+. Има светлочервен цвят, тъй като абсорбира зелената и синята светлина. Плътността ѝ е 8.96 g/cm<sup>3</sup>, а температурата на топене - 1083° C (Лазаров, 1984). Подобно на среброто и златото, медта е благороден метал. Тя се отличава с ковкост, ниска корозионна способност, лесно образува сплави с други метали. По своите електро- и топлопроводност се нарежда на второ място след среброто. Елементът не взаимодейства с водата и не се разтваря в киселини, които не проявяват окислителни свойства (Лазаров, 1984; Barceloux, 1999).



## Разпространение

Медта е един от широко разпространените в земната кора метали. Среща се предимно под формата на сулфиди, оксиди и карбонати (Лазаров, 1984). Концентрацията ѝ в земната кора е 55 ppm, а в морската вода –  $3 \times 10^{-3}$  mg/L (Krupanidhi et al., 2008).

Разпространението на медта в почвата се влияе от климатични, геоложки и антропогенни фактори. Освен геоложки източници и индустриално замърсяване, други антропогенни източници, свързани със селскостопанската дейност, могат да увеличат нивата на мед в почвите, особено в трайните насаждения като маслинови горички и лозя (Ballabio et al., 2018). Различните практики в управлението на селското стопанство имат съответно влияние върху концентрацията на Cu. Медта се използва традиционно като фунгицид за обработка на някои постоянни култури. Комбинираният ефект на свойствата на почвата, като високо рН, наличие на органичен въглерод и глина от една страна и топлите и влажни климатични условия от друга, благоприятства натрупването на мед в местата, където се отглеждат лозя и дървесни култури. (Panagos et al. 2018, Orgazzi et al. 2018).

В растенията медта е основният кофактор на множество белтъци/ензими. Точният брой на тези така наречени купропротеини е неизвестен, но те изпълняват важни функции в растителните клетки. За осъществяването им е необходимо минимално количество Cu. Излишъкът от Cu може да окаже вредно влияние върху първичното производство на растенията и дори върху оцеляването им. Поддържането на равновесието на този елемент е от съществено значение за растенията и е строго контролирано. (Printz et al. 2016).

Известни са растения, които проявяват склонност да натрупват мед, извличайки я от техните местообитания – почва или вода. Такива са: *Aeolanthus biformifolius*, *Athyrium yokoscense*, *Azolla filiculoides*, *Bacopa monnieri*, *Brassica juncea* L., *Callisneria Americana*, *Eichhornia crassipes*, *Haumanistrum robertii*, *Helianthus annuus*, *Larrea tridentate*, *Lemna minor*, *Pistia stratiotes* и *Thlaspi caerulescens* (Krupanidhi et al., 2008).

Медта е основен микроелемент, който не може да се образува от човешкото тяло, така че трябва да се приема от хранителни източници всеки ден. Според Световната здравна организация са необходими 1–3 mg Cu на ден, за да се предотвратят всякакви симптоми на дефицит. Различни организации по здравеопазване и хранене по света са определили диетични референтни стойности, подчертавайки значението на медта като част от балансираното хранене (Alexandrova et al., 2003).

На практика, всяка клетка в нашия организъм използва мед и, заедно с желязото и цинка, медта е един от трите минерали, които са от съществено значение за нормалното функциониране на човешкия организъм. Медта е жизненоважна за здравето на хората от развитието на плода до старостта.

### Медта е от съществено значение за:

- Развитие на мозъка по време на феталното и постнаталното развитие и поддържане на функционирането му през целия живот, включително осигуряване на ефективна антиоксидативна защита;
- Ефективна комуникация между нервните клетки;
- Поддържане на здрава кожа и съединителна тъкан;
- Заздравяване на рани;
- Структурна цялост и функция на сърцето и кръвоносните съдове;

- Растеж на нови кръвоносни съдове;
- Поддържане на правилна структура и функция на циркулиращите кръвни клетки;
- Образуването на клетките на имунната система (бели кръвни клетки);
- Поддържане на здравословен и ефективен имунен отговор;
- Генериране и съхранение на енергия в „електроцентралите“ на нашите клетки - митохондриите.

## **Прицелни тъкани и органи (разпределение на мед в организма)**

### **Чернен дроб**

След поглъщането медта се абсорбира от тънките черва в кръвта. Тук Cu се свързва с транспортни протеини, които я пренасят в черния дроб. След като медта бъде погълната тя се пренася с транспортни белтъци до черния дроб за екскретиране или за съхранение в жлъчката.

Медта играе централна роля в превръщането на желязото в неговата използвана - Fe(III), и също така помага за транспортиране на желязото в тялото. Недостигът на мед може да доведе до анемия и „претоварване“ с желязо на тъканите. (Doguer et al. 2018).

### **Мозъкът и нервната система**

Медта е от решаващо значение за нормалното развитие на мозъка и нервната система. Той играе роля в производството и поддържането на миелина, който изолира нервните клетки, като по този начин осигурява правилното предаване на нервните импулси. Медта участва в синтеза на невротрансмитери – биологично активни молекули, които осъществяват комуникацията между нервните клетки. Недостигът на Cu може да доведе до развитие на дегенеративни процеси в нервната система (Cheri et al. 2017).

### **Сърце**

Медта е от съществено значение за синтеза на колаген. Той се среща в съединителната тъкан, която е основната поддържаща и свързваща тъкан на тялото. Медта е необходима за здравословния тонус и нормалното функциониране на мускулите и играе жизненоважна роля в сърдечната дейност. Недостигът на Cu може да доведе до сърдечна недостатъчност.

### **Кръвоносни съдове**

Медта е кофактор на ензими, които участват в процесите на кръвосъсирване. Кръвоносните съдове са заобиколени и защитени от съединителна тъкан, а медта помага да се поддържа тяхната еластичност, особено за аортата и по-малките артерии. Недостигът на мед може да доведе до проблеми с кръвообращението и ниско кръвно налягане (Tohru et al. 2018).

### **Кожа**

Медта е от съществено значение за осъществяването на широк спектър биологични функции, които играят важна роля за поддържането на здравата кожа, а именно: тонус, заздравяване на рани и защита от ултравиолетова (UV) светлина.

Медта е необходима за производството на колаген и еластин, два компонента, които осигуряват здравина и еластичност на кожата. Като кофактор на ензима тирозиназа, медта участва в синтеза на пигмента на кожата - меланин, който осигурява защита от

UV лъчение. Недостигът на мед може да доведе до дегенерация на кожата и загуба на пигментация.

### **Кости**

Колагенът е основният структурен материал в костите. Омрежването на молекулите на колагена влияе върху тяхната здравина. В този процес участват ензими, чийто кофактор е мед. Недостигът на мед може да доведе до фрактури, скелетни аномалии и остеопороза (Xinhua et al. 2018).

### **Имунна система**

Медта е необходима за поддържане на структурата и функционирането на белите кръвни клетки, много от които имат фагоцитираща активност. Недостигът на мед може да доведе до намаляване на броя на белите кръвни клетки, потискане на имунната система и повишена чувствителност към инфекции (Alexandrova et al., 2003).

### **Мед и хранене**

Медта се набавя от широк гръг пресни и преработени храни. Сред богатите на Cu източници са зърнени храни, ядки (особено бразилско кашу), месо (черен дроб и бъбреци), миди, бобови растения (грах и боб) и семена. Тъмният шоколад също е с високо съдържание на мед. Добре балансираната и разнообразна диета осигурява ежедневните нужди от мед (Alexandrova et al., 2003). Препоръчителният дневен прием на мед при възрастни е 900 микрограма (Institute of Medicine, Food and Nutrition Board).

### **Дефицит на мед**

Медта е есенциален микроелемент. Дефицитът на Cu причинява сериозни здравословни проблеми, но се среща рядко. Той се причинява по-често от генетични дефекти в белтъците, отговорни за транспортиране на този метал, отколкото от диета с ниско съдържание на мед. Има случаи, в които медта е налична, но не може да навлезе в клетките (Alexandrova et al., 2003).

### **Излишък от мед**

Приемът и отделянето на мед са строго балансирани, за да се осигуряват непрекъснато нуждите на организма. Натравяне с мед е рядко срещано, до голяма степен ограничено до случайно пиене на разтвори от меден нитрат или меден сулфат, които трябва да се пазят от лесен достъп в дома. Те, както и органичните медни соли, са мощни средства за предизвикване на повръщане и приетите големи дози обикновено се отхвърлят чрез рефлукс. Способността на здравия човешки черен дроб да отделя мед е значителна и хроничното отравяне с мед е много рядко, като малкото съобщения за това засягат предимно пациенти с чернодробни заболявания (Alexandrova et al., 2003, <https://copperalliance.eu/benefits-of-copper/health/>).

### **Заболявания, свързани с обмяната на мед**

Описани са следните три групи аномалии при метаболизма на медта:

1. Меден дефицит – придобит вследствие на бедна на мед диета (първичен меден дефицит) или влошена абсорбция (вторичен меден дефицит), както и генетично обусловен (болест на Менкес). Вторичният меден дефицит може да се дължи на присъствие на други тежки метали в храната, които на конкурентен принцип намаляват усвояването на Cu в храносмилателния тракт. Особено внимание в това отношение заслужава молибденът;
2. Натрупване на мед – придобит или генетично обусловен (Болест на Уилсън);

3. Ацерулоплазминемия – намалена активност на ензима ферооксидаза, водещ до натрупване на желязо (Krupanidhi et al., 2008; Trocello et al., 2010).

### **Болест на Уилсън**

Болестта на Уилсън, известна също като хепатолентикуларна дегенерация, е автозомно-рецесивно генетично разстройство, което е резултат от анормален метаболизъм на медта. (Fei et al. 2016). Заболяването е свързано с мутация в Холоцерулоплазмина – белтък, който съдържа метал-свързващи мотиви. (Pfeil et al. 1999). Включването на мед в апоцерулоплазмин зависи от действието на АТФаза от Р-тип, която се намира в транс-Голджи апарата и се нарича АТР7В. Белтъкът има 6 метални свързващи мотива в своя N-терминален домен. Този протеин насочва включването на медта както в апоцерулоплазмина, така и в лизозомите. Причината за мутацията на протеина е от мутация в гена АТР7В и води до натрупване на мед в ключови органи, като черния дроб, централната нервна система, бъбреците, роговицата на окото и други тъкани, при което нормалното им функциониране се нарушава (Goodman et al. 2009). Отлагането на мед започва веднага при раждането, като симптомите обикновено се проявяват в края на юношеството. Болестта на Уилсън обикновено се манифестира с две често срещани прояви: чернодробно заболяване или неврологични симптоматика, поради голямото участие на чения дроб и ЦНС в натрупването на мед. При юношите се наблюдават по-често симптоми, свързани с чернодробни патологии, докато възрастните пациенти показват предимно неврологични признаци. Болестта на Уилсън е рядко заболяване, засягащо един човек на 30 000 в повечето популации (Rodriguez et al. 2015; Pfeiffer, 2016). Проучвания установяват нарастване на честотата на тази генна мутация в изолирани популации като Коста Рика и остров Сардиния край Италия. (Rodriguez et al. 2015). Основните симптоми на болестта на Уилсън са най-често чернодробни, неврологични и психиатрични, степента на изявата им е от съвсем лека до тежка, която, ако не бъде лекувана, може да бъде фатална (Rodriguez et al. 2015).

Чернодробната форма може да се прояви като асимптоматична, остър хепатит, остра / хронична чернодробна недостатъчност и цироза. Други симптоми, които могат да се проявят, са хемолитична анемия, нискостепенна хемолиза и жълтеница (Rodriguez et al. 2015).

Неврологичното симптоматика може да се изрази в атетоидни движения и нестабилна походка, състояние, наподобяващо болестта на Паркинсон, атаксия, псевдосклероза, доминирана от тремор, и дистоничен синдром, който често води до контрактури (Rodriguez et al. 2015).

Други симптоми от страна на ЦНС включват трепене на ръцете, ригидност на лицето и мускулите и дизартрия. (Goodman et al. 2009).

Психиатричните симптоми може да се изявят в координацията ръка-око, в емоционални и поведенчески промени. Характерни са т.нар. пръстен на Kayser Fleischer. (Rodriguez et al. 2015).

При хората с болестта на Уилсън може да се наблюдават множество различни усложнения, които са пряко свързани с излишъка на мед в прицелните органи. В тежките случаи обаче, може да бъдат засегнати и други органи и системи. Описано е проявлението на мускулно-скелетни смущения, включително мускулна атрофия, контрактури, деформации, остеомалация и патологични фрактури. (Goodman et al. 2009).

Други по-рядко срещани симптоми, които могат да се проявят поради болестта на Уилсън, са остеоартрит, някои анормални показатели на бъбречна функция и кардиомиопатия (Fei et al. 2016).

### **Болест на Менкес**

Болестта на Менкес е свързано с Х-хромозомата рецесивно наследствено състояние, което влияе върху начина, по който организма обработва нивата на мед. Причинява се мутации в гена АТР7А. Засяга предимно нервната система и съединителната тъкан със симптоми, които с течение на времето се влошават. Симптомите на болестта обикновено се появяват през първите няколко месеца от живота и включват рядка коса; забавен растеж и развитие, припадъци. В допълнение може да се наблюдават нисък мускулен тонус (хипотония), отпуснати черти на лицето и смущения в интелектуалното развитие. Повечето деца с болестта на Менкес имат тежки симптоматика, водеща до смърт в ранна възраст. По-благоприятна е прогнозата при т.нар „Синдромът на окципиталния рог“, чиято изява започва в годините на ранно до средно детство. Със сравнително най-лека симптоматика е формата при възрастни хора, която засяга предимно нервите и мускулите. Болестта на Менкес засяга предимно момчетата. Ранното диагностициране и лечение чрез прием на мед може да подобри дългосрочния резултат при някои деца. (Kaler et al. 2016, Vairo et al.2019).

### **Мед-съдържащи протеини и ензими**

Мед-съдържащите ензими и протеини участват в осъществяването на редица жизнено важни процеси, като: синтез на АТФ (цитохром с оксидаза; ЕС 1.9.3.1; ССО); обмяна на кислород (супероксид дисмутаза; ЕС 1.15.1.1. SOD); транспорт на желязо (церулоплазмин; Ср; ЕС 1.16.3.1.); формиране на извънклетъчен матрикс (лизил оксидаза; ЕС 1.4.3.13); невроендокринни пептиди (пептидилглицин  $\alpha$ -амидираща монооксигеназа; ЕС 1.14.17.3; ПАМ), синтез на норадреналин (допамин  $\square$  монооксигеназа; ЕС 1.14.17.1.) и меланин (тирозиназа, ЕС 4.1.99.2); обмяна на хистамин и полиамини (диаминооксидаза; ЕС 1.4.3.6. DAO) (Faila, 1999; Alexandrova et al., 2003).

### **Мед и ракови заболявания**

Повишени нива на мед са открити при много видове злокачествени новообразувания при човека, включително на простатата, млечната жлеза, дебелото черво, белия дроб и мозъка. Съобщено е, че използването на медни хелатори може да има терапевтична стойност при лечението на някои ракови заболявания. Установено е, че смеси от медни хелатори и медни соли действат като ефективни протеазомни инхибитори и индуктори на апоптоза, по-специално в раковите клетки. От друга страна, докладвано е за антитуморен ефект на редица мед-съдържащи съединения, някои от които се разглеждат като потенциални антитуморни агенти. Интересът към тях е голям, тъй като механизма им на действие е различен от този на широко използваните в клиничната практика платинови антинеопластични лекарства. В допълнение, медта е есенциален за човека и животните микроелемент и се очаква да проявява по-слаба токсичност в сравнение с цисплатината например (Tisato et al 2010).

**Благодарности:** Проучването е проведено с финансовата подкрепа на Фонд „Научни изследвания“ при МОН, България – Договор № ДКОСТ 01/10 от 22.10.2018 г.

## Използвана литература

- Лазаров, Д. Обща и неорганична химия. Издателство „Наука и изкуство“, София, 1984
- Ackerman, C.M. and C. J. Chang. Copper signaling in the brain and beyond. Copper and cobalt mobility in soil and accumulation in a metallophyte as influenced by experimental manipulation of soil chemical factors. *Chemosphere*, 2016, 146, 75-84.
- Alexandrova, R., G. Rashkova, I. Alexandrov, W. Tsenova, R. Tudose, O. Costisor. Briefly about copper. *Exp. Pathol. Parasitol.*, 2003, 6/12, 3-12.
- Ballabio, C., P. Panagos, E. Lugato, J.H. Huang, A. Orgiazzi, A. Jones, O. Fernández-Ugalde, P. Borrelli, L. Montanarella. Copper distribution in European topsoils: An assessment based on LUCAS soil survey. *Sci Total Environ*, 2018, 636, 282-298.
- Barceloux, D. G. and Dr. D. Barceloux. Copper, *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 1999, 37(2) 217-230.
- Bruno, P., L. Stanley, H. Jean-Francois, S. Kjell. Copper Trafficking in Plants and Its Implication on Cell Wall Dynamics, *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7, 601.
- Doguer, C., J.-H. Ha, J. F. Collins. Intersection of Iron and Copper Metabolism in the Mammalian Intestine and Liver. *Compr Physiol*. 2018, 8(4), 1433–1461.
- Faila, M. L. Considerations for determining “optimal nutrition” for copper, zinc, manganese and molybdenum., *Proc. Nutr. Soc.*, 1999, 58, 497-505.
- Fei, W., W. Jing, P. Chunwen, Q. Liang, J. Chunmeng. Wilson's Disease: A Comprehensive Review of the Molecular Mechanisms. *International Journal Of Molecular Sciences*. 2016, 16(3), 6419-6431.
- Fukai, T., M. Ushio-Fukai, J. H. Kaplan Am. Copper transporters and copper chaperones: roles in cardiovascular physiology and disease. *J Physiol Cell Physiol*. 2018, 315(2), C186–C201.
- Goodman, C.C. and K.S. Fuller *Pathology: implications for the physical therapist*. 3rd ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2009.
- Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*. Washington, DC: National Academies Press; 2001.
- Kaler, S. ATP7A-Related Copper Transport Disorders. *GeneReviews*. Updated Aug. 18, 2016; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1413>.
- Krupanidhi, S., A. Sreekumar, C.B. Sanjeevi. Copper and biological health. *Indian J Med Res*, 2008, 128(4), 448.
- Orgiazzi, A., C. Ballabio, P. Panagos, A. Jones, O. Fernández-Ugalde. LUCAS Soil, the largest expandable soil dataset for Europe: A review. *European Journal of Soil Science*, 2018, 69(1), 140-153.
- Panagos, P., C. Ballabio, E. Lugato, A. Jones, P. Borrelli, S. Scarpa, A. Orgiazzi, L. Montanarella. Potential Sources of Anthropogenic Copper Inputs to European Agricultural Soils. *Sustainability*, 2018, 10, 2380.
- Pfeiffer, R.F. Wilson Disease. *Continuum (Minneapolis)*. 2016, 22(4 Movement Disorders), 1246-61.

Pfeil, S.A. and D.J. Lynn. Wilson's disease: copper unfettered. *J Clin Gastroenterol.*, 1999, 29, 22-31.

Qu, X., Z. He, H. Qiao, Z. Zhai, Z. Mao, Z. Yu, K. Dai. Serum copper levels are associated with bone mineral density and total fracture *J Orthop Translat*, 2018, 14, 34–44.

Rodriguez-Castro, K., F. Hevia-Urrutia, G. Sturniolo Wilson's disease: A review of what we have learned. *World Journal Of Hepatology*, 2015, 7(29), 2859-2870.

Tisato, F., C. Marzano, M. Porchia, M. Pellei, C. Santini. Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies. *Med Res Rev.* 2010, 30(4), 708-49.

Trocello, J.M., J.P. Guichard, A. Leyendecker, M. Pernon, P. Chaine, S. El Balkhi, J. Poupon, P. Chappuis, F. Woimant. Corpus callosum abnormalities in Wilson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2011, 82(10), 1119-21.

Vairo, F.P.E., B.C. Chwal, S. Perini, M.A.P. Ferreira, A.C. de Freitas Lopes, J.A.M. Saute. A systematic review and evidence-based guideline for diagnosis and treatment of Menkes disease. *Mol Genet Metab.* 2019,126(1), 6-13.

<https://www.britannica.com/science/copper>

<https://copperalliance.eu/benefits-of-copper/health/>

## Биологична активност на кобалт

Десислав Динев, Абдулкадир Абудаллах, Радостина Александрова

*Институт по експериментална морфология патология и антропология с музей – БАН,  
София, България*

### Резюме

Кобалтът е един от най-важните микроелементи в света на животните и хората. Под формата на витамин В12 (кобаламин) този метал играе ключова роля в редица биологични процеси. Кобаламинът е необходим за синтеза на ДНК, образуването на еритроцити, нормалното функциониране на нервната система, растежа и развитието на децата. Недостигът на витамин В12 предизвиква различни патологични състояния, включително анемия и невропсихиатрични разстройства. Доказано е значението на елемента за имунната система. Кобалтът има относително ниска токсичност, но професионалното излагане на въздействието на този елемент може да доведе до неблагоприятни последици за здравето, засягайки различни органи или тъкани.

**Ключови думи:** микроелементи, кобалт, витамин В12, кобаламин, дефицит, токсичност

### Химия

Кобалтът е твърд, сребристо-бял, лъскав метал. Той е член на VIII група от периодичната система с пореден номер 27 и атомна маса 58.93. Кобалтът има плътност  $8.9 \text{ g/sm}^3$ , точка на топене  $1493^\circ\text{C}$ , точка на кипене  $3100^\circ\text{C}$ , твърдост по Моос 5.5, специфична електропроводимост  $15,5.106\text{S/m}$ . Притежава феромагнитни свойства и поставен в силно магнитно поле придобива магнитни свойства, които губи при  $1121^\circ\text{C}$ . По своите физични свойства е подобен на желязото и никела. Елементът е активен химически, като образува много съединения. Кобалтът е стабилен на въздух и не се влияе от водата, но се атакува от разредени киселини.

### Приложения

Кобалтът влиза в състава на редица сплави (суперсплави за части в двигатели на газотурбинни самолети, устойчиви на корозия сплави, т.нар. високоскоростни стомани, циментирани карбиди), в магнити и магнитни носители на запис. Кобалтови съединения се използват като катализатори в петролната и химическата промишленост, като сушилни агенти за бои и мастила. Кобалтовото синьо е важна част от палитрата на художниците и се използва от занаятчиите при изработването на порцелан, керамика, витражи, плочки и бижута от емайл.

Кобалтът е есенциален елемент и влиза в състава на витамин В12, който изпълнява редица жизненоважни роли във физиологията на човешкия организъм. Под формата на изотоп ( $^{60}\text{Co}$ ) кобалтът се използва в лъчетерапията, а също и при за облъчване на храни старилизиране / консервиране и защита на потребителя.

Други медицински употреби на кобалт включват откриване на тумори и метастази, стерилизация на хирургично оборудване и изобразяване на мозъчни увреждания. В състава на различни сплави кобалтът намира приложение и в производството на различни медицински устройства, например за изработване на заместители на тазобедрената и колянната става, както и зъбни протези.



## Разпространение

Кобалтът се открива в плодородните почви, както и в растенията. Той е сравнително рядък метал и представлява около 0.001% от земната покривка. Среща се предимно под формата на арсениди, оксиди и сулфида (Angerer, Heinrich, 1988; Barceloux, 1999). Основните руди, съдържащи кобалт, са кобалтит, еритрит, глаукодот, скутерудит. В Сахелианска Африка, по-точно в южната част на Демократична република Конго, концентрациите на Co в някои региони може да надвишат хиляди пъти тази в нормалната почва (Lange et al. 2016). През 2005 г. най-голям дял от световното производство на кобалт се е падало на Демократична република Конго (40%), следвано от Канада, Замбия, Русия, Бразилия и Куба (<http://en.wikipedia.org/wiki/cobalt>).

## История

Кобалтът е открит през 1735 г. от шведския химик George Brandt (1694-1768). Той доказва, че именно на кобалта се дължи синия цвят на стъклата - свойство, което до този момент е било свързано с наличие на бисмут. Името кобалт идва от немската дума *kobold*, – термин, използван от миньорите за означаване на рудата. Елементът е изучен относително добре от Бергман, Тенар и Берцелиус. Кобалтът се използва за оцветяване на керамика и стъкло от 1450 г. пр. н.е. от вавилонците и египтяните, а също и от китайците от времето на династиите Tang (618-907) и Ming (1368-1644). Наличие на кобалт е доказано в египетски скулптури и персийски накити от III хилядолетие п.н.е., в руините на Помпей (разрушен 79 с.н.е.). Едва през 20-ти век е бил използван кобалт в сплави. Техните високи точки на топене, голяма якост при повишени температури и устойчивост на окисляване от горещи газове повишава търсенето на кобалта за редица производства, включително на реактивни двигатели, ракетни дюзи и газови турбини. Над 75% от световния добив на кобалт се използва в производството на сплави. Кобалтът се използва и под формата на циментирани волфрамови карбиди и високоскоростни стомани. Кобалтовите съединения са мощни изсушилни благодарение на действието си като окислителни катализатори за полимеризация на ненаситени глицериди. Кобалтът е важен източник на катализатори за петролната промишленост, както и за двигатели с вътрешно горене за намаляване на атмосферното замърсяване.

## Физиологична роля

Изчислено е, че дневната нужда от кобалт при човек е 40-50 µg. В тялото на възрастен човек се съдържа около 1 mg кобалт, което означава, че металът не се натрупва в организма. Черният дроб, бъбреците, сърцето и мускулите съдържат по-голямо количество кобалт за разлика от други органи (Angerer, Heinrich, 1988). Приет *per os* металът се абсорбира частично в тънкото черво. Екскретирането на елемента става главно чрез фекалиите (около 60.95%), а също и чрез урината (Angerer, Heinrich, 1988). Кобалт, прилаган самостоятелно в концентрация от 50 µM, води до значително намаляване на растежа на растенията и увеличаване на оксидативния стрес, а междувременно капацитетът за отстраняване на активни кислородни радикали се увеличава, за което говори повишеното съдържание на фитохелатин и глутатион, както и експресията на съответните гени (HvPCS1 и HvGR1) (Jonas et al., 2020). Кобалтът е основен микроелемент за човешкото тяло и може да се среща в органични и неорганични форми. В органичната си форма кобалтът е компонент на витамин B12 и играе важна роля за образуването на аминокиселини и някои белтъци в нервните клетки, както и при синтезирането на невротрансмитери. Солите на кобалта се прилагат в медицината при лечение на анемия. Неорганичните форми на кобалт, присъстващи в

йонна форма, са токсични за човека и колкото по-дълго се съхраняват в тялото, толкова повече промени в клетките причиняват.

Кобалтът попада в човешкия организъм по няколко начина: 1) с храната; 2) чрез дихателната система; 3) от кожата; 4) като компонент на биоматериали и медицински устройства. Кобалтът и неговите сплави намират широко приложение при създаването на ортопедични импланти от около 40 години. Корозията на метала е основният проблем при употребата им. Освободените от повърхността на импланта метални йони може да причинят възпалителни реакции и реакции на свръхчувствителност от тип IV, предизвиквайки асептично разхлабване и отхвърляне на импланта. Тези йони се абсорбират от макрофагите, впоследствие се активира освобождаването на провъзпалителни молекули, като интерлевкин-1 (IL-1), интерлевкин-6 (IL-6), тумор некротичен фактор - алфа (TNF- $\alpha$ ) и простагландини (Alexandrova et al., 2004; Czarnek et al 2015., Jonas et al. 2020).

### **Токсичност**

Кобалтът и неговите съединения проявяват сравнително ниска токсичност. Системните ефекти върху здравето се изразяват в клиничен синдром, включващ главно неврологични (напр. слухови и зрителни смущения), сърдечносъдови и ендокринни прояви. Установено е, че водоразтворимите соли на кобалта се отличават с по-висока токсичност от неразтворимите. Остри фатални интоксикации с кобалт не са документирани. В моделни системи на бозайници *in vitro* е доказана способността на по-високи концентрации кобалтовите йони и свободен кобалт да предизвикват цитотоксичност и да индуцират апоптоза и некроза с възпалителен отговор. Има данни за генотоксичност на кобалтови соли, която най-вероятно се причинява от свободни кислородни радикали, може би съчетано с потискане на възстановяването на ДНК. Доказан е канцерогенният ефект на кобалт и кобалтов сулфат при лабораторни животни, но все още не е категорично установен при хората (Simonsen et al 2012). Предполага се, че някои от токсичните ефекти на кобалта ( $\text{Co}^{2+}$ ) се дължат на предполагаемо конкурентно инхибиране с  $\text{Ca}^{2+}$  за вътреклетъчните  $\text{Ca}^{2+}$ -свързващи белтъци (Alexandrova et al., 2004).

Способността на елемента да взема участие в образуването на еритроцитите и хемоглобина е използвана дълго време за терапевтични цели. Тази форма на лечение обаче, може да доведе до хипотиреоидизъм и тиреоидна хиперплазия, тъй като кобалтовите йони потискат приема на йод от щитовидната жлеза (Angerer, Heinrich, 1988).

За основната част от населението храната и напитките са основният източник на кобалт. В промишлеността обаче съществува потенциален риск от интоксикация с този елемент, например при производството на кобалтов прах (Lauwerys, Lison, 1994; Barceloux, 1999). Двете основни прицелни зони при интоксикация с кобалт са кожата и дихателната система. Контактът на кобалта с кожата може да доведе до дерматит или екзема, особено ако целостта ѝ е наранена (Chiappino, 1994). Поразяването на дихателната система се изразява в алвеолити, астматични състояния, интерстициален склеротичен бял дроб и др. Въздействието с кобалт може да предизвика и кардиомиопатии (Chiappino, 1994; Alexandrova et al., 2004).

### **Биологична роля**

Основната биологична роля на кобалта в организма на животните и човека е свързана с участието му в структурата на витамин B12 (Фиг. 1).

## Витамин В12

Кобаламинът (Витамин В12) е една от най-сложните устроените малки молекули (Фиг. 4), срещани се в природата и единственият витамин, съдържащ микроелемент (Warren et al., 2002). Той е важна хранителна добавка, синтезирана само от определени, намиращи се в почвата, микроорганизми (Markle, 1996). Известни са два начина за образуването на кориновия пръстен – анаеробен и аеробен, които се различават преди всичко по мястото на включване на кобалтовия йон (Scott, Roessener, 2002). Кобаламинът се среща предимно в храните от животински произход – месо (особено черен дроб и бъбреци), риба, яйца и млечни продукти (Herrmann, Geisel, 2003; Watanabe, 2007). Изчислено е, че дневната доза от витамин В12 при човек е 1 µg. Кобаламинът е голяма полярна молекула, която се свързва със специални транспортни молекули на еритроцитите. Навлизането на витамина в организма при физиологични условия се осъществява в илеума и изисква свързването на кобаламина със специален фактор, т. нар. *Intrinsic factor* (IF) (Russel-Jones, Alpers, 1999). Бионаличността на витамин В12 в организма на здрав човек се дължи основно на приема на риба, овче и пилешко месо – съответно 42%, 56%-59% и 61%-66%. В сравнение с останалите животински продукти, намиращият се в яйцата витамин В12 се абсорбира слабо (~ 9%). Предполага се, че от включения в храната витамин В12, в нормално функциониращата храносмилателна система на здрав човек се усвояват около ~ 50%. Повечето от използваните като хранителни добавки в някои страни синьо-зелени водорасли (цианобактерии) съдържат псевдовитамин В12, който не е активен при човек (Watanabe et al., 2007).

В12 е сложно устроен органометален кофактор, който има важно значение за нормалното функциониране на три подсемейства ензими – аденозинкобалтзависими изомеразы, метилкобалтзависими метилтрансферази и дехалогенази (Banerjee, Ragsdale, 2003). При повечето бактерии и при всички бозайници кобаламинът регулира синтезирането на ДНК косвено, като повлиява един от етапите в метаболизма на фолиевата киселина – превръщането на N5 метилтетрахидрофолата в тетрахидрофолат, който от своя страна е свързан с превръщането на хомоцистеина в метионин. Тази реакция протича в цитоплазмата и се катализира от ензима метилтрансфераза, чиито кофактор е метилкобаламин (Kennedy et al., 1992; Alexandrova et al., 2004).

## Недостиг на витамин В12

Дефицитът на витамин В12 (кобаламин) е често срещана причина за макроцитна анемия и е замесен в спектър от невропсихиатрични разстройства. Ролята на дефицита на витамин В12 при хиперхомоцистеинемия и насърчаването на атеросклероза е обект на активни изследвания. Диагностицирането на дефицит на витамин В12 обикновено се основава на измерване на серумните нива на витамин В12. Трябва да се отбележи обаче, че около 50% от пациентите със субклинично заболяване имат нормални нива на витамин В12. По-чувствителен метод за определяне на дефицит на витамин В12 е измерването на нивата на серумна метилмалонова киселина и хомоцистеин, които се увеличават рано при недостиг на този витамин. Използването на теста на Шилинг за откриване на пернициозна анемия е заменено в повечето случаи от серологично тестване за доказване на наличие на антитела срещу париеталните клетки и вътрешния фактор. Проучванията показват, че пероралното приемане на витамин В12 е безопасно и ефективно лечение за състоянието на дефицит на този витамин. Дори когато вътрешният фактор не присъства, за да подпомогне усвояването на витамин В12 (при пернициозна анемия) или при други заболявания, които засягат обичайните места на абсорбция на витамина в крайните отдели на илеума, пероралната терапия си остава ефективна (Brown et al., 2003; Alexandrova et al., 2004).

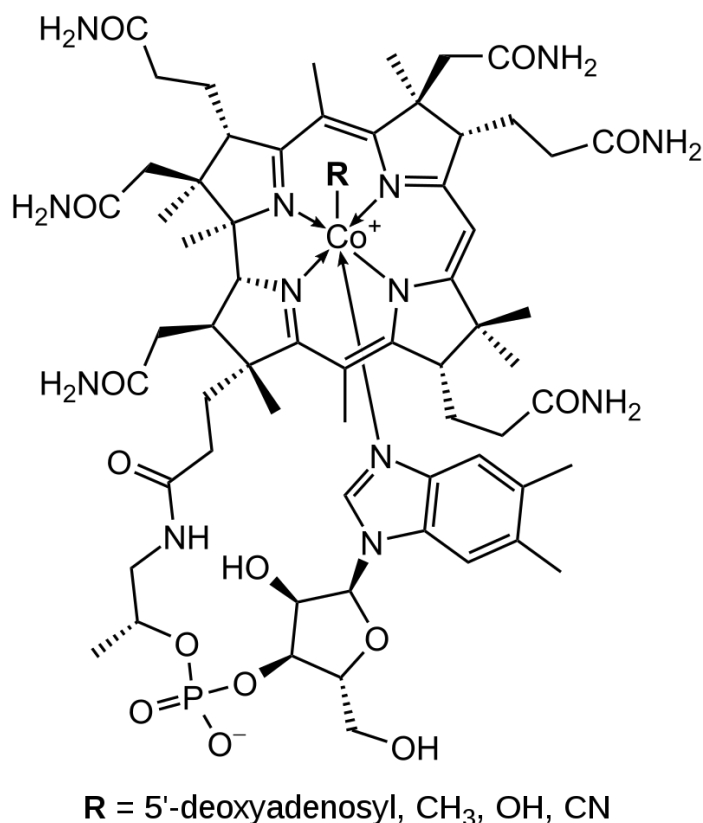
Недостигът на витамин В12 най-често се дължи на проблеми в усвояването му – недостатъчно всмукване; смущения в употребата и складирането му; взаимодействие с хранителни вещества, водещо до намалена абсорбция и/или инактивиране на витамина (Dharmarajan et al., 2003). Към застрашените от развитие на дефицит групи се отнасят възрастните хора; пациенти, приемащи противоязвени медикаменти за дълъг период от време; вегетарианците (особено така наречените вегани, които изобщо не приемат риба и други храни от животински произход); болните от СПИН; хора, претърпели операции на стомаха или тънкото черво (Markle, 1996; WHO и FAO, 2004).

Безспорно, пернициозната анемия е най-важната причина за недостиг на витамин В12. Това състояние се причинява от липсата на вътрешния фактор (Intrinsic Factor), дължаща се на атрофия на стомашната лигавица вследствие развитието на аутоимунни реакции (Andres et al., 2004).

Условно, измененията, съпътстващи липсата на витамин В12, са обособени в 5 фази: Фази 1 и 2 се характеризират с ниски плазмени нива на хомотранскобаламин II. Във фаза 3 се отчитат повишени нива на хомоцистеин и метилмалонова киселина при ниски нива на хомотранскобаламин. Във фаза 4 клиничните симптоми са най-силно изразени, а във фаза 5 се наблюдават необратими невро-психиатрични смущения (Herrmann, Geisel, 2003). Усложненията, породени от недостига на витамин В12 са многообразни, като варират от летаргия до загуба на телесно тегло и отслабване на способността за запаметяване (Dharmarajan et al., 2003).

Витамин В12 допринася (заедно с витамини А, В6, С, D, Е и микроелементите Fe, Zn, Cu и Se) за осъществяването на защитната функция на клетките на имунната система, включително образуването на антитела (Maggini et al., 2007). Съобщено е, че повишеният прием на някои микроелементи, в т.ч. витамин В12, понижава риска от увреждане на генома (Fenech, 2007).

Малабсорбцията на В12 е най-честата причина за дефицит на витамин В12 при възрастни хора. Дефицитът на В12 обикновено се наблюдава при наличие на достатъчен прием на В12 с храната. Това състояние се характеризира с невъзможност за освобождаване на В12 от храната или от свързващи В12 протеини, особено в присъствието на хипохлорхидрия, където абсорбцията на „несвързан“ В12 е нормална. 60% - 70% от пациентите в старческа възраст с дефицит на В12 страдат от малабсорбция на В12 от храната, което се наблюдава предимно при стомашна атрофия. Повече от 40% от хората над 80-годишна възраст са засегнати от стомашна атрофия, която може да бъде свързана с инфекция с *Helicobacter pylori*. Факторите, които допринасят за влошената абсорбция на витамин В12 от храната при пациенти в напреднала възраст, са: хроничен пренос на *H. pylori* и чревна микробна пролиферация след продължително антибиотично лечение, антагонисти на H2-рецепторите и инхибитори на протонната помпа, хроничен алкохолизъм, хирургична интервенция в областта на стомаха, частична екзокринна недостатъчност на панкреаса и синдром на Sjögren. Хроничният атрофичен гастрит тип В е свързан с инфекцията с *H. pylori* и е известно, че причинява малабсорбция на витамин В12. Това заболяване води до ниско производство на пепсин и влошен прием на В12 от храната. Освобождаването на В12 от богата на белтък храна е намалено в случай на понижена стомашна киселинност (Herrmann et al., 2003; Alexandrova et al., 2004).  
[https://www.aafp.org/afp/2003/0301/p979.html?mod=article\\_inline](https://www.aafp.org/afp/2003/0301/p979.html?mod=article_inline)



**Фиг. 4. Витамин B12**

([https://bg.wikipedia.org/wiki/%D0%92%D0%B8%D1%82%D0%B0%D0%BC%D0%B8%D0%BD\\_B12](https://bg.wikipedia.org/wiki/%D0%92%D0%B8%D1%82%D0%B0%D0%BC%D0%B8%D0%BD_B12))

**Благодарности:** Проучването е проведено с финансовата подкрепа на Фонд „Научни изследвания“ при МОН, България – Договор № ДКОСТ 01/10 от 22.10.2018 г.

### Използвана литература

- Ackerman, Ch.M. and J.C. Chang. Copper signaling in the brain and beyond. *J Biol Chem.* 2018, 293(13), 4628–4635.
- Alexandrova, R., R. Tudose, E. Arnaudova, O. Costisor, L. Patron. Cobalt. *Exp. Pathol. Parasitol.*, 2004, 7/2, 3-14.
- Alpers, D.V., G. Russel-Jones. Intrinsic factor, haptocorrin and their receptors. R. Banerjee (Ed.), *Chemistry and biochemistry of B12*, Jhon Wiley & Sons Inc, New York, 1999, 411-440.
- Andrès, E. et al. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *CMAJ*, 2004, 171(3) 251-259.
- Angerer, J.. Cobalt [Biomonitoring Methods in German language, 1988] Documentations and Methods, 1988. 10.1002/3527600418.bi744048verd0009.

- Banerjee, R. and S.W. Ragsdale. The Many Faces of Vitamin B12: Catalysis by Cobalamin-Dependent Enzymes *Annual Review of Biochemistry*, 2003, 72(1), 209-247.
- Barceloux D. G. and Dr. D. Barceloux. Cobalt, *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 1999, 37(2), 201-216.
- Chiappino, G. Hard metal disease: clinical aspects. *Sci Total Environ*. 1994, 150(1-3), 65-8.
- Czarnek, K., S.Terpiłowska, A. Siwicki. Review paper Selected aspects of the action of cobalt ions in the human body. *Central European Journal of Immunology*, 2015, 40(2), 236-242.
- Dharmarajan, T.S., G.U. Adiga, E.P. Norkus. Vitamin B12 deficiency-recognizing subtle symptoms in older adults. *Geriatrics*, 2003, 58, 30-38.
- Fenech, M. Genome health nutrigenomics and nutrigenetics – diagnosis and nutritional treatment of genome damage on an individual basis, *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46(4), 1365-1370.
- Hanmura, T., M. Ichihashi, Y. Watanabe, N. Isomura, T. Kondow. Reactions of Nitrogen Monoxide on Cobalt Cluster Ions: Reaction Enhancement by Introduction of Hydrogen. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2007, 111(3), 422-428
- Herrmann, W., H. Schorr, R.Obeid, J. Geisel. Vitamin B-12 status, particularly holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations, and hyperhomocysteinemia in vegetarians. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2003, 78(1), 131–136.
- Herrmann, W., R. Obeid, H. Schorr, J. Geisel. Functional vitamin B12 deficiency and determination of holotranscobalamin in populations at risk. *Clin Chem Lab Med*, 2003, 41, 1478-88.
- Kennedy, D.G., W.J. Blanchflower, J.M. Scott, D.G. Weir, A.M. Molloy, S. Kennedy, P.B. Young. Cobalt-vitamin B-12 deficiency decreases methionine synthase activity and phospholipid methylation in sheep. *J. Nutr.*, 1992, 122, 1384.
- Lange, B., O. Pourret, P. Meerts, P.Jitaru, B. Cancès, Cl. Grison, M.-P. Faucon. Copper and cobalt mobility in soil and accumulation in a metallophyte as influenced by experimental manipulation of soil chemical factors. *Chemosphere*, 2016, 146. 75-84.
- Lauwerys, R. and D. Lison. Health risks associated with cobalt exposure — an overview, *Science of The Total Environment*, 1994, 150 (1–3), 1-6.
- Maggini, S., E. Wintergerst, S. Beveridge, D. Hornig. Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. *British Journal of Nutrition*, 2007, 98(S1), S29-S35.
- Markle H.V. and Greenway D.C. Cobalamin, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 1996, 33(4), 247-356.
- Oh, R., D.L. Brown. Vitamin B12 deficiency. *Am Fam Physician*. 2003, 67(5), 979-86.
- Rima, O., J. Geisel, H. Schorr, U. Hübner, W.Herrmann. The impact of vegetarianism on some haematological parameters. *European Journal of Haematology*. 2002, 69( 5-6), 275-279.
- Scott, A.I. and C.A. Roessner. Biosynthesis of cobalamin (vitamin B12). *Biochem Soc Trans*, 2002, 30(4), 613–620.
- Simonsen, L.O., H. Harbak, P. Bennekou. Cobalt metabolism and toxicology-a brief update. *Sci Total Environ*, 2012, 432, 210-5.

Wa Lwalaba, J.L., L.T. Louis, G. Zvobgo, M.E.A. Richmond, L. Fu, S. Naz, M. Mwamba, R.P.M. Mundende, G.Zhang. Physiological and molecular mechanisms of cobalt and copper interaction in causing phyto-toxicity to two barley genotypes differing in Co tolerance. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 187, 109866.

Warren, M.J., E. Raux, H.L. Schubert, J.C. Escalante-Semerena. The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B12). *Nat Prod Rep*, 2002, (4), 390-412.

Watanabe, F. Vitamin B12 Sources and Bioavailability. *Experimental Biology and Medicine*, 2007, 232(10), 1266-1274.

## Evaluation of male reproduction in conditions of experimentally induced hyperglycemia in rat

Pavlova E.<sup>1</sup>, Vladov I.<sup>1</sup>, Zapryanova S.<sup>2</sup>, Petrova, E.<sup>1</sup>, Gluhcheva, Y.<sup>1</sup>, Atanassova N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Experimental Morphology, Pathology and Anthropology with Museum,  
Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria*

<sup>2</sup>*Institute of Biology and Immunology of Reproduction, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia,  
Bulgaria*

**Corresponding author:** Ekaterina Pavlova, e\_bankova@yahoo.com

**Problem:** Male reproduction is sensitive to hyperglycemia and early life is especially crucial for normal proceeding of spermatogenesis. In this respect our study aimed to evaluate the effects of Diabetes mellitus (DM) in neonatal or prepubertal period on germ- (GC) and Sertoli cell (SC) number, expression of marker proteins of Sertoli and Leydig cells (LCs) and serum testosterone (T) levels on day 25 in rat (puberty).

**Methods of study:** Male pups were i.p. injected with a single dose of 100 mg/kg b.w. on day 1 to induce neonatal diabetes (NDM) or on day 10 to induce prepubertal diabetes (PDM). Diabetic status of animals was confirmed by increased blood glucose, more pronounced in PDM compared to NDM. On day 25 testes were sampled, fixed in Bouen solution and embedded in paraffin. 5 µm sections were used for standard ABC-HRP immunohistochemistry for androgen receptor (AR, 1:100, Santa Cruz) and 3β-Hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD, 1:500, Santa Cruz). Serum testosterone (T) was measured by ELISA Kit (Elabscience Inc., USA). Stereological techniques were used to determine the nuclear volume per testis of GCs and SCs.

**Results:** On day 25 in control rat testes the spermatogenesis is not completed and 4 types of germ cell associations can be observed. AR is localized in SC, LCs and peritubular cells with stage-specific manner of expression in SCs. Immunohistochemical investigation shows weaker intensity of AR reaction and uniform model of expression in SCs of PDM but not in NDM model. These data correspond to reduction of plasma T levels in PDM (64% lower than control) and NDM (40% lower) and weaker 3β-HSD expression in steroid producing LCs. Quantitative study of GC number in PDM demonstrate reduction of total GC population and in particular mitotic spermatogonia (40 % lower than control) and meiotic spermatocytes (12 % lower).

**Conclusion:** Prepubertally induced DM affected androgen production and action in the rat testis and data suggest different sensitivity of germ cell types to hyperglycemia in puberty.

**Key words:** Diabetes mellitus, spermatogenesis, rat

**Acknowledgement:** This study was supported by Grant № KP-06-M21/3 for Junior Basic Researchers and Postdocs from the Bulgarian National Science Fund.



## **Preliminary study of the antiparasitic effect of snail hemocyanins and mucus on mice infected experimentally with *Trichinella pseudospiralis***

Katerina Todorova<sup>1</sup>, Ivelin Vladov<sup>1</sup>, Valeria Dilcheva<sup>1</sup>, Ani Georgieva<sup>1</sup>, Reneta Toshkova<sup>1</sup>,  
Ivan Iliev<sup>1</sup>, Pavlina Dolashka<sup>2</sup> and Svetlozara Petkova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Experimental Morphology, Pathology and Anthropology with Museum, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria, Acad. G. Bonchev Str., Bl. 25, 1113, Sofia, Bulgaria*

<sup>2</sup>*Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, Bulgarian Academy of Sciences, Acad. G. Bonchev str. Bl. 9, 1113 Sofia, Bulgaria*

e-mail: katerinagencheva@yahoo.com

*Trichinella pseudospiralis* (*T. pseudospiralis*) was first isolated in Russia from raccoon's skeletal muscles. This parasite has a wide geographic range of distribution due to the migration of its main hosts - birds, although the parasite is limited by low temperatures (Smyth, J. 1962). *Tr. pseudospiralis* spends its entire life in one host and feeds on the intracellular products of muscle histolysis in the early stages of nematode's development, which is a traumatical process, related with a release of cell contents and fluids. Hemocyanins (unspecific immunostimulants with a great application in modern medicine) are oxygen-transporting copper- containing metalloproteins, isolated from blood of some invertebrate animals and are intensively studied in various therapeutic directions.

The aim of this study was to assess the antiparasitic effect of hemocyanins isolated from *Helix aspersa* and *Helix lucorum* on the developing nematode larvae by s.c. application in the form of an experimental vaccine.

**Materials and methods:** Four months old male laboratory mice with average weight about 30 g. were used in the experiment, infected *per os* with 250 *Trichinella pseudospiralis* larvae. Animals were distributed in groups, each treated three times with 1 mg/kg subunit  $\alpha$  – HaH (hemocyanine from *Helix aspersa*), subunit  $\beta$ c – HIH (hemocyanine from *Helix lucorum*) or *Helix aspersa* mucus, diluted separately in PBS and Al(OH)<sub>3</sub> prepared as a single component vaccine. After a period of one month of the invasion of *T. pseudospiralis*, animals were sacrificed and skeletal muscles were processed for histological observations. **Results:** The histological features observed were connected with minor healing of muscle fibers destroyed during nematode' movements in all three groups. Slight formation of a nurse cell, reminiscent of the encapsulation in the species-*Trichinella spiralis*, but without collagenous structure, composed of collagen type IV and VI -areas with metamorphosis of myocytes expressed in rounding and centering of nuclei, a change in the cytoplasm/nucleus ratio, relative to the surrounding cells was also shown. As a general finding there was a lack of enhanced eosinophilic and lymphocytic infiltration around the larvae in the groups treated with the hemocyanins from *Helix aspersa*, may be due to parasite -induced lack of local immunity or was connected with the free migration throughout the muscle tissues reported by Pozio E. and Zarlenga D.S. (2005). Only in the group treated with the hemocyanin from *Helix lucorum* immune cell reaction was observed. We suppose that this hemocyanin is a stronger immunomodulator in relation to this parasitic species and overcomes its mechanisms of concealment. A prominent finding in this group was also the more common areas with destruction of muscle fibers in the places where a larva has moved and the inflammatory focal reaction around some larvae. These results may be related to the more pronounced

antiparasitic properties of subunit  $\beta$ c – H1H hemocyanin from *Helix lucorum*, compared to the ones isolated from *Helix aspersa*, which will be a targeted study further.

**Key words:** hemocyanins, *Helix aspersa*, *Helix lucorum*, vaccination, *T. pseudospiralis*

Smyth, J. Introduction to Animal Parasitology. London: Cambridge University Press, 1962.  
Pozio, E. and D.S. Zarlenga. Recent advances on the taxonomy, systematics and epidemiology of Trichinella. Int J Parasitol., 2005, 35, 1191-1204. 10.1016/j.ijpara.2005.07.012.

**Acknowledgement:** This study was supported by contract № Д01-217/30.11.2018, Program BioActiveMed, Ministry of Education and Science of the Republic of Bulgaria

## Physiological responses of pea plants to treatment with synthetic auxins and auxin-type herbicide

Dessislava Todorova<sup>1</sup>, Iskren Sergiev<sup>1</sup>, Elena Shopova<sup>1</sup>, Liliana Brankova<sup>1</sup>, Jurga Jankauskiene<sup>2</sup>, Sigita Jurkonienė<sup>2</sup>, Virgilija Gavelienė<sup>2</sup>, Rima Mockevičiūtė<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Plant Physiology and Genetics, Bulgarian Academy of Sciences,  
Acad. G. Bonchev Str., Bl. 21, 1113 Sofia, Bulgaria*

<sup>2</sup>*Nature Research Centre, Institute of Botany, Laboratory of Plant Physiology,  
Akademijos Str. 2, 08412 Vilnius, Lithuania  
e-mail: dessita@bio21.bas.bg*

The effect of exogenously applied auxin-type herbicide 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) on growth and antioxidant defense of young pea plants, preliminary treated with two synthetic auxin compounds 1-[2-chloroethoxycarbonyl-methyl]-4-naphthalenesulfonic acid calcium salt (TA-12) and 1-[2-dimethylaminoethoxycarbonylmethyl]naphthalene chlormethylate (TA-14) was examined. All chemicals were applied by foliar spaying of seedlings. Applied alone TA-12 and TA-14 had no significant effects, but they modulated the 2,4-D induced changes on most of the investigated biochemical parameters. The shoot fresh weight reduction, caused by 2,4-D was partially overcome by the use of TAs. Apart from this, no significant changes were observed in the other biometric parameters. Treatment with 2,4-D did not enhance lipid peroxidation, and hydrogen peroxide content was slightly increased. These data indicate that treatment with 2,4-D did not cause severe oxidative stress, which is also confirmed by the results of the antioxidant defense system. The application of 2,4-D provoked accumulation of thiol-containing compounds, free proline and phenolic compounds and increased the antioxidant enzyme activities (GST, SOD, CAT, POD and GR). Pretreatment with TAs noticeably decreased the non-enzymatic antioxidants (free proline, total phenolics and total low-molecular thiols) in comparison with plants treated with 2,4-D only. With exception of GR, TAs pretreatment returned the enzyme values to levels close to the controls. Based on the results obtained we suggest that the application of both synthetic auxins could modulate 2,4-D herbicide effects.

**Keywords:** antioxidants, auxins, 2,4-D, pea, stress markers.

**Acknowledgments:** The study was supported by the joint research project under the Bulgaria-Lithuania Scientific Cooperation (2019–2021).

## Assessment of application of selective herbicide on biochemical responses of young wheat seedlings grown under drought stress

Iskren Sergiev, Zornitsa Katerova, Elena Shopova, Liliana Brankova,  
Ljudmila Dimitrova, Dessislava Todorova

*Institute of Plant Physiology and Genetics – Bulgarian Academy of Sciences  
Acad G. Bonchev Str., Bl. 21. 1113 Sofia, Bulgaria  
e-mail: dessita@bio21.bas.bg*

Drought is an abiotic stress factor seriously disrupting plant development and decreasing crop productivity. Wheat is relatively tolerant to drought stress during vegetative growth. Herbicides are commonly used in agriculture against weeds. The Serrate® herbicide (Syngenta product) is a preparation with two active chemical substances: clodinafop-propargyl (an inhibitor of fatty acid biosynthesis) and pyroxsulam (an inhibitor of amino acid biosynthesis) used to control annual cereals and broadleaf weeds in cereal crops. It is systemic and selective for wheat (being tolerant).

Wheat (*Triticum aestivum* L., cv. Sadovo-1) seedlings were grown as soil culture in growth chambers (22°C/19°C, 16 h photoperiod, 60% relative air humidity). Seventeen days old plants were leaf sprayed with an aqueous solution of Serrate® (according to the manufacturer's instructions), 72h later drought stress was applied for 7 days (withholding irrigation to reach a water deficit of 60% below the normally watered control), and then 96h for recovery (transfer to normal irrigation). Some markers of oxidative stress, non-enzymatic, and enzymatic antioxidants were analyzed on whole shoots at 0h, 96h, and 168h of drought stress, and at 96h of recovery. Four variants were monitored: 1) control (C, normally irrigated), 2) herbicide-treated plants (H, normally irrigated), 3) drought (D, for 7 days) and 4) plants, treated with herbicide and subsequently drought-stressed for 7 days (DH).

Herbicide-treated plants led to moderate but gradual increase in phenolics, thiol-containing compounds and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, but malondialdehyde and proline varied insignificantly during the experimental period along with enzymatic activities. Drought and DH stressed plants significantly enhanced non-enzymatic antioxidant defense and oxidative stress markers, being highest 134-fold for proline in DH at 168h of stress, but tending to reach the respective control levels in this variant at 96h of recovery.

Compared to the respective control, enzymatic activities of catalase, guaiacol peroxidase, glutathione reductase, and superoxide dismutase increased in treated (D and DH) seedlings being highest at 168h of drought then tending to decrease, except catalase at 96h of recovery. In general, DH treatment caused less alteration of all measured parameters than the drought stress at recovery period. On the basis of data obtained it can be concluded that the application of selective herbicide provoked cross-adaptation biochemical responses of wheat seedlings grown under drought stress conditions.

**Keywords:** antioxidants, drought, herbicide, stress markers, wheat.

**Acknowledgments:** This study was supported financially by the grant KP-06-N36/3 (30.09.2020) of National Science Fund, Ministry of Education and Science, Republic of Bulgaria.

## **Bacterial pathogen *Xanthomonas euvesicatoria* alter oxidative defence system in Pepper plants (*Capsicum annum* L.)**

Brankova L.<sup>1</sup>, Kizheva Y.<sup>2</sup>, Rasheva I.<sup>2</sup>, Hristova P.<sup>2</sup>, Urshev Z.<sup>3</sup>, Ivanov S.<sup>4</sup>, Shopova E.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>*Institute of Plant physiology and Genetics, Bulgarian Academy of Sciences*

<sup>2</sup>*Faculty of Biology, Sofia University*

<sup>3</sup>*LB Bulgaricum PLC R&D Center*

<sup>4</sup>*Centre of Food Biology*

Plant diseases are one of the major risk factors associated with reduced productivity of economically important crops. To study the infection process in *Xanthomonas euvesicatoria* - Pepper plant (*Capsicum annum* L.) pathosystem we investigated the changes in a number of physiological and biochemical parameters in infected plants. The levels of some endogenous protective compounds (low-molecular-weight thiols, glutathione, phenols and proline) and the activity of the main antioxidant enzymes (catalase, guaiacol peroxidase, glutathione reductase, superoxide dismutase) were established. They were monitored in the course of the infectious process and compared to similar ones in healthy plants (controls). Analysis of the antioxidant protection system in treated plants under normal and stress conditions lead to the acquisition of new knowledge of the infectious process in this pathosystem, as well as the ability to control the phytopathogen infection.

**Acknowledgment:** This study is a part from the project KII-06-H36-1/29 SEP 2020 “Study of bacteriophage-phytopathogen-plant pathosystem for control of bacteriosis on economically important crops” funded by National Science Fund.