



Първо национално лятно училище по природни продукти с приложения в медицината

Творчески дом на БАН, Варна
28.06 – 04.07.2021





РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ
МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО
И НАУКАТА



1869

 **ANTISEL**



Biomed Future
The Innovative Future For Biology And Medicine

гр. София
тел: 021 943 33 63
biomed@netbg.com



РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ
Министерство на
образованието и науката



РМС № 658 от 14.09.2018 г.
ДО1-217/30.11.2018 г.

НАЦИОНАЛНА НАУЧНА ПРОГРАМА

Иновативни нискотоксични
биологично активни средства
за прецизна медицина
БиоАктивМед

www.bioactivemed-nrp.com



ПРОГРАМА		
28.06.2021 Понеделник		
16:00-18:00 Регистрация		
18:00-19:00 Чаша вино за Добре дошли		
Младежка конференция		
29.06.2021 Вторник		
10:00-10:30	Евдокия Пашева	Тържествено откриване на мероприятияето. Приветствено слово.
10:30-10:45	Ася Даскалова	Участие на въглехидратните структури във формирането на сложните четвъртични структури на <i>Haliotis tuberculata</i> хемоцианин
10:45-11:00	Димитър Кайнаров	Изследване на антитуморната активност на хемоцианини от мекотели върху постоянна клетъчна линия T24 на карцином на пикочния мехур
кафе пауза 11:00-11:30		
11:30-11:45	Златина Влахова	Изследване активността на биологично активни екстракти от <i>Rapana venosa</i> върху панел от различни туморни линии
11:45-12:00	Александър Цинцаров	Изследване на синергичен цитотоксичен ефект между стандартни химиотерапевтици и екстракти от <i>Rapana venosa</i> върху клетъчни линии от рак на гърдата
12:00-12:15	Венцеслав Атанасов	Протеинов профил на болестта на Алцхаймер при скополаминов модел на плъх с приложение на екстракт от охлюви като невропротективно средство
12:15-12:30	Инна Суликовска	Тест за фототоксичност на природни продукти
12:30-12:45	Кристина Малинова	Биологично активни вещества – цитотоксично и потенциращо действие.
обяд 12:45-14:00		
14:00-14:15	Ивайло Славчев	Фероценови производни като кандидати за антиракова терапия
14:15-14:45	Мария Шрьодер	Противотуморни свойства на новосинтезиран фероцен-съдържащ камфор сулфонамид при клетъчни модели на рак на млечна жлеза и бял дроб
14:45-15:00	Явор Данов	Полизахаридни криогелни носители, съдържащи β -циклодекстрин за доставяне на канабидиол
15:00-15:15	Лазар Лазаров	Ефект на канабидиол (CBD) върху белодробни клетъчни линии
15:15-15:30	Александър Душков	Изследване на противотуморния потенциал на екстракти от някои видове български гъби
30.06.2021 Сряда		
9:30-9:45	Ани Георгиева	Антитуморна активност на влакнести материали, съдържащи кверцетин
9:45-10:00	Ирина Георгиева	Изследване на структурни промени в мембранната динамика под действието на антитуморни липиди
10:00-10:15	Ариана Лангари	Морфометрично характеризиране на червени кръвни клетки, свързано с ранна загуба на плода. Роля на клетъчното стареене
10:15-10:30	Румен Стаматов	Методи за регистрация на микроскопски изображения
кафе пауза 10:30-11:00		
11:00-11:15	Радина Николова	Таксономичен и функционален анализ на почвения микробиом по концентрационния градиент на замърсяване с тежки метали
11:15-11:30	Атанас Курутос	Терагностични биомаркери, абсорбиращи в близката ИЧ област
11:30-13:00 обяд		
Младежко лятно училище		
13:00-13:30	Павлина Долашка	Същност и биологично приложение на мас-спектрометрията
13:30-14:00	Людмила Велкова	Двудименсионална гел електрофореза - успешен метод за откриване на протеини в смеси
14:00-14:30	Ася Даскалова	SDS-PAGE и 2D-PAGE анализ на хаплоидни и диплоидни <i>Saccharomyces cerevisiae</i> клетки
01.07.2021 Четвъртък		
10:30-15:30	Тематични научни работилници на открито	
19:00 Официална вечеря		

02.07.2021 Петък		
10:00-10:30	Спиро Константинов	Полезни модели и изследователски техники от експерименталната хематология и онкология
10:30-11:00	Антониос Трохопулос	Протеомен и микроарей анализ в онкофармакологията
кафе пауза 11:00-11:30		
11:30-12:00	Петър Петров	Блоксъполимерни носители за наномедицина: от мицели със структура “ядро-обвивка” до мултифункционални наночастици
12:00-12:30	Даринка Христова	Температурно-чувствителни съполимерни мрежи на основата на поли(N-изопропилакриламид): дизайн и регулиране на свойствата за биомедицински приложения
12:30-13:00	Александър Долашки	Биоактивни съединения с потенциално приложение в медицината
03.07.2021 Събота		
10:00-10:30	Галина Радева	Молекулярен анализ на микробиома
10:30-11:00	Леандър Литов	Моделиране на взаимодействия на биомолекули
кафе пауза 11:00-11:30		
11:30-12:00	Елена Кръчмарова Геновска Начева	Съвременни методи за изследване на белтъчни взаимодействия
12:00-12:30	Мария Петрова Йордана Тодорова	Класиката е модерна: PCR и Western blot - подходите, без които не можем
12:30-13:00	Ива Угринова	Заклучителна лекция и награждаване

УЧАСТИЕ НА ВЪГЛЕХИДРАТНИТЕ СТРУКТУРИ ВЪВ ФОРМИРАНЕТО НА СЛОЖНИТЕ ЧЕТВЪРТИЧНИ СТРУКТУРИ НА *HALIOTIS TUBERCULATA* ХЕМОЦИАНИН

Ася Даскалова¹, Александър Долашки¹, Людмила Велкова¹, Анна Куюмджиева², Венцеслава Петрова² и Павлина Долашка¹

¹ *Институт по органична химия с Център по фитохимия, Българска академия на науките, 1113 София*

² *Софийски университет „Св. Климент Охридски“, Биологически факултет, Катедра по обща и индустриална микробиология, 1164 София*

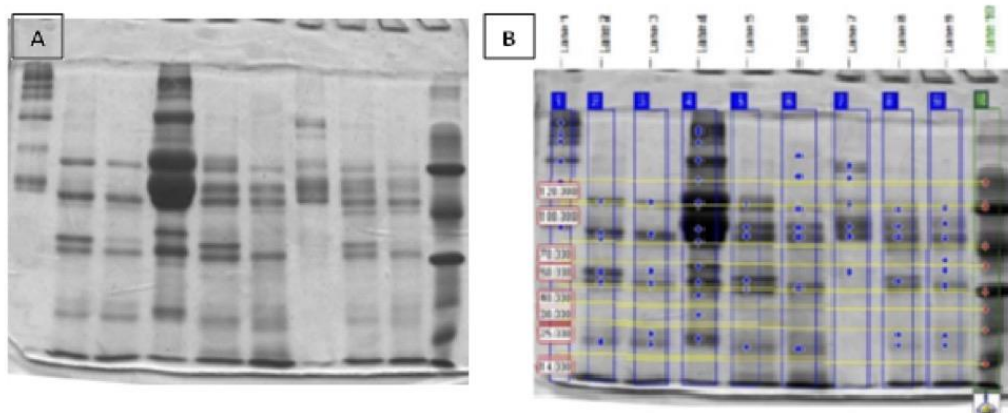
Едни от представителите на кислород-пренасящите металопротеини са хемоцианините, които се съдържат предимно в хемолимфата на мекотели и членестоноги. Те представляват голям интерес за науката и медицината поради тяхната комплексна четвъртична въглехидратна структура и имуностимулиращи, антимикробни, антивирусни и антитуморни свойства. Хемоцианините притежават сложна структура и са разделени в два основни класа: хемоцианини от мекотели и хемоцианини от членестоноги. Доказано е, че хемоцианини от мекотели имат по-високо въглехидратно съдържание и сложни структури в сравнение с хемоцианини от артроподи.

С цел характеризиране на четвъртичната структура на хемоцианин от морски охлюв *Haliotis tuberculata* (HtH) е приложен нов подход за доказване на въглехидратната му структура чрез култивиране на дрожди *Saccharomyces cerevisiae* в хранителна среда, съдържаща HtH и двете субединици HtH1 и HtH2. Изказана е хипотеза, че дрождите продуцират ензими - гликозидази, които разграждат комплексните структури на гликаните в хемоцианините.

Промяната в молекулните маси (MW) на получените фракции след култивиране на *S. cerevisiae* в присъствие на HtH и субединиците е отразена в резултатите на 10% SDS PAGE електрофорези. Наблюдаваните фракции с по-ниски MW са получени в резултат на хидролиза на гликаните в хемоцианина, като са получени различни функционални единици (FUs). Гликозилираният характер на FUs е доказан чрез орцинол/ H₂SO₄ тест.

Получените резултати доказват участие на въглехидратните вериги в узграждане на третичната структура на хемоцианини от тип Molluscs.

Благодарности: Тази работа е подкрепена от изследователски проект ДН 11/10 15.12.2017., финансиран от ФНИ на Министерството на образованието и науката в Република България. Авторите изказват своята благодарност на МОН за финансовата подкрепа по Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“, одобрена с РМС №658 от 14.09.2018 г., договор ДО1-217/30.11.2018 и споразумения ДО1-323/18.12.2019 и ДО1-358/17.12.2020.



Фиг.1. А/ 10% SDS PAGE електрофореза на функционални единици получени при култивиране на дрожди *Saccharomyces cerevisiae* в хранителна среда, съдържаща НtН и двете субединици НtН1 и НtН2.
В/ Обработка на 10% SDS PAGE електрофореза със софтуерен продукт ImageQuant TL 8.1.

Ref Band	Lane 1			Lane 2			Lane 3			Lane 4			Lane 5			Lane 6			Lane 7			Lane 8			Lane 9			Lane 10					
	non-treated Hc 7 mug 5 ml			treated Hc 0h 5 ml			treated Hc 24h 5 ml			non-treated HtH1 48 mug			treated HtH1 0h 5ml			treated HtH1 24h 5ml			non-treated HtH2 7 mug 5 ml			treated HtH2 0h 7 mug 5 ml			treated HtH2 24h 7 mug 5 ml			standard PHMW SDS 5 ml					
Number	Band No	Volume	Calto Vol(MW (kd)	Band No	Volume	Calto Vol(MW (kd)	Band No	Volume	Calto Vol(MW (kd)	Band No	Volume	Calto Vol(MW (kd)	Band No	Volume	Calto Vol(MW (kd)	Band No	Volume	Calto Vol(MW (kd)	Band No	Volume	Calto Vol(MW (kd)	Band No	Volume	Calto Vol(MW (kd)	Band No	Volume	Calto Vol(MW (kd)	Band No	Volume	Calto Vol(MW (kd)			
1	1	459114	266.335							2	5020452	244.071																					
2	2	2469708	234.563							3	3228111	212.768																					
3	3	2354121	214.268							4	1814886	189.054				4	904012	182.014	4	3554594	189.145												
4	4	2493990	185.451							5	1815111	136.048				5	950896	144.076	5	1381338	141.204												
5	5	203440	131.101							6	1219771	136.048				6	4285403	100.338	6	2320764	97.793	6	1214746	191.795	6	2894088	96.795	6	1541982	99.261	6	11223074	100
6	6	1534542	118.22	6	1205302	112.548	6	2021228	102.713	7	1219884	191.409				7	13808104	74.029	7	919089	76.835	7	4811288	77.839	7	738632	79.138	7	4700736	79.138			
7	7	3321664	82.216							8	13808104	74.029				8	6941197	68.571	8	6176940	68.571	8	6223656	68.779	8	6526171	68.968	8	4515417	68.044			
8	8	1440198	75.194							9	13808104	74.029				9	6941197	68.571	9	6176940	68.571	9	6223656	68.779	9	6526171	68.968	9	4515417	68.044			
9				9	4540120	69.582	9	5891483	70.01	10	11089444	64.021				10	6941197	68.571	10	6176940	68.571	10	6223656	68.779	10	6526171	68.968	10	4515417	68.044			
10				10	1412220	64.388				11	11089444	64.021				11	6941197	68.571	11	6176940	68.571	11	6223656	68.779	11	6526171	68.968	11	4515417	68.044			
11										12	1540382	43.128	12	1538056	44.767	12	1538056	44.767	12	1538056	44.767	12	1538056	44.767	12	1538056	44.767	12	1538056	44.767			
12										13	1672765	38.391	13	13683277	39.887	13	1463133	39.386	13	14848265	37.235	13	1574817	37.788	12	1588554	45.484	12	4882432	41.127	12	1514244	46.644
13										14	1880331	34.232				14	1880331	34.232							13	13683277	39.888	13	13683277	39.888	13	13683277	39.888
14										15	1488420	21.337	15	1488420	21.337	15	1488420	21.337	15	1488420	21.337	15	1488420	21.337	15	1488420	21.337	15	1488420	21.337	15	1488420	21.337
15										16	1488420	21.337	16	1488420	21.337	16	1488420	21.337	16	1488420	21.337	16	1488420	21.337	16	1488420	21.337	16	1488420	21.337	16	1488420	21.337
16										17	1488420	21.337	17	1488420	21.337	17	1488420	21.337	17	1488420	21.337	17	1488420	21.337	17	1488420	21.337	17	1488420	21.337	17	1488420	21.337

Фиг.2. Представяне на промяната в молекулните маси (MW) на получените функционални единици след култивиране на *S. cerevisiae* в присъствие на НtН и субединиците му.

ИЗСЛЕДВАНЕ НА АНТИТУМОРНАТА АКТИВНОСТ НА ХЕМОЦИАНИНИ ОТ МЕКОТЕЛИ ВЪРХУ ПОСТОЯННА КЛЕТЪЧНА ЛИНИЯ T24 НА РАК НА ПИКОЧНИЯ МЕХУР

Димитър Кайнаров¹, Александър Долашки¹, Людмила Велкова¹, Олга Боянова²,
Волфганг Фьолтер³ и Павлина Долашка¹

¹ *Институт по органична химия с Център по фитохимия, БАН, ул. Г. Бончев, бл. 9, 1113
София*

² *Катедра по медицинска генетика, Медицински университет-София, ул. Здраве 2, 1431
София*

³ *Институт по биохимия, Университет в Тюбинген, Hoppe-Seyler-Straße 4, D-72076
Тюбинген, Германия*

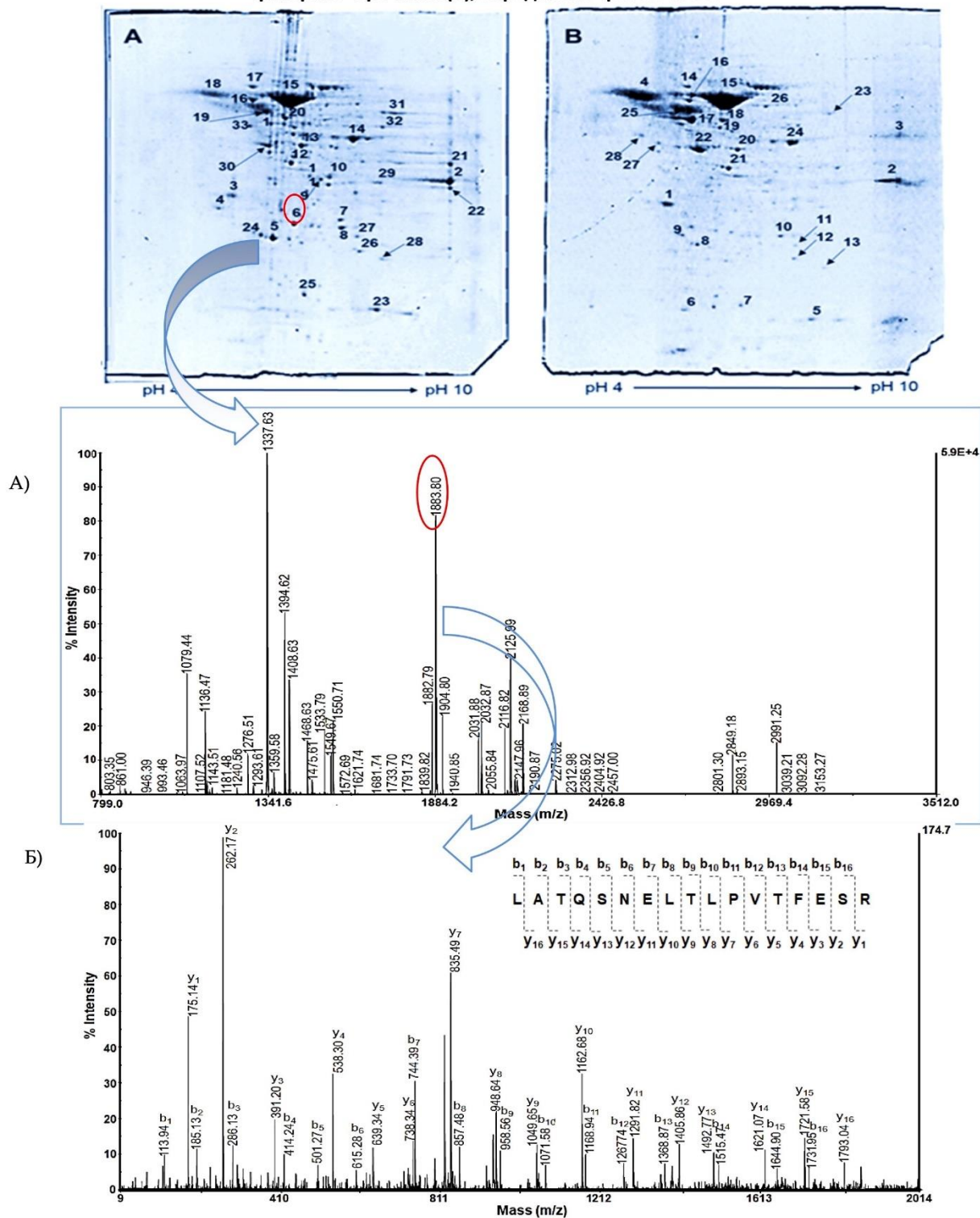
Повишеният интерес към хемоцианините (Хц-те) през последните години се дължи, както на важната им биологична функция и сложна структура, така и на възможностите за тяхното практическо приложение в медицината и фармацията. Хц-те са мед-съдържащи кислород транспортни гликопротеини с изключително висока молекулна маса и сложна четвъртична структура, разтворени в хемолимфата на много артроподи и мекотели. Хемоцианините (Hcs) от мекотели имат значителен имунологичен и анти tumorен потенциал, което позволява прилагането им в онкологията.

Анти tumorната активност на (Хц-ни) от морски охлюви *Rapana venosa* (RvH), *Megathura crenulata* (KLH) и градински охлюви *Helix lucorum* (НН) и техните различни форми са изследвани *in vitro* върху постоянна клетъчна линия T24 на рак на пикочния мехур и нормална уротелиална клетъчна линия HL 10/29 в сравнение с доксорубицин. Получените резултати показват, че T24 туморната клетъчна линия е чувствителна към действието на тестваните: изоформи и гликозилирани функционални единици (ФЕ-и) на тези хемоцианини. Установено е селективно инхибиране на растежа на T24 клетки след инкубация с изоформи β c-НН и RvНН и ФЕи β c-НН-h и RvНН-e, в зависимост от дозата и времето. Флуоресцентните микрографии не показват апоптотични или некротични изменения след тестване на HL 10/29. Функционалната единица β c-НН-h демонстрира най-висок антипролиферативен ефект (подобно на доксорубицин), при който се наблюдават предимно апоптотични и по-малко некротични изменения в туморните клетки.

С помощта на протеомен анализ са идентифицирани десет протеина със значителна промяна в експресията, които могат да бъдат свързани с пътя на апоптоза. Настоящото изследване е първото, отразяващо промените в експресията на протеините в човешки клетки на карцином на пикочния мехур под въздействието на ФЕ β c-НН-h, което вероятно се дължи на специфичните ѝ олигозахаридни структури, богати на метилирани хексози. Това може да е от съществено значение за взаимодействията на β c-НН-h с въглехидратни остатъци, изложени на повърхността на туморните клетки и наблюдаваната анти tumorна активност.

Благодарности: Тази работа е подкрепена от българското Министерство на образованието и науката (грант D01-217/30.11.2018) по Националната изследователска програма „Иновативни ниско токсични биоактивни системи за прецизна медицина (BioActiveMed)“, одобрена от ДСМ # 658 / 14.09 .2018.

Промяна на експресията на протеини от туморни клетки T24 преди (А) и след третиране с β -НИН-н (Б), определени чрез 2D-PAGE



Масспектрометричен анализ на протеин A6 от 2D-PAGE: А) MS спектър на пептиди, получени след трипсинолиза A6 (идентифициране на Топлинен шоков протеин β 1 (HSPB1_HUMAN) с MW 22 768 Da; Б) MS/MS анализ на пептид [M+H]⁺ при m/z 1906.20 от A6, потвърждаващ HSPB1_HUMAN.

ИЗСЛЕДВАНЕ АКТИВНОСТТА НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ЕКСТРАКТИ ОТ *RAPANA VENOSA* ВЪРХУ ПАНЕЛ ОТ РАЗЛИЧНИ ТУМОРНИ ЛИНИИ

Златина Влахова¹, Йордана Тодорова¹, Людмила Велкова², Александър Долашки²,
Павлина Долашка², Ива Угринова¹

¹Институт по молекулярна биология „Академик Румен Цанев“, Българска академия на науките, ул. Акад.Г.Бончев, бл. 21, София 1113

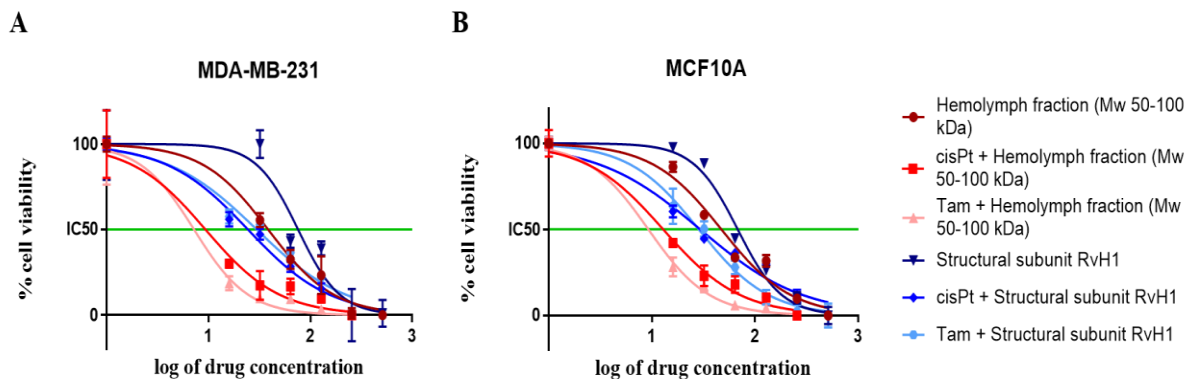
²Институт по органична химия с Център по фитохимия, Българска академия на науките, ул. Акад.Г. Бончев, бл. 9, София 1113

Ключови думи: хемоцианин, хемолимфа, *Rapana venosa*, антитуморно действие, биоактивни продукти

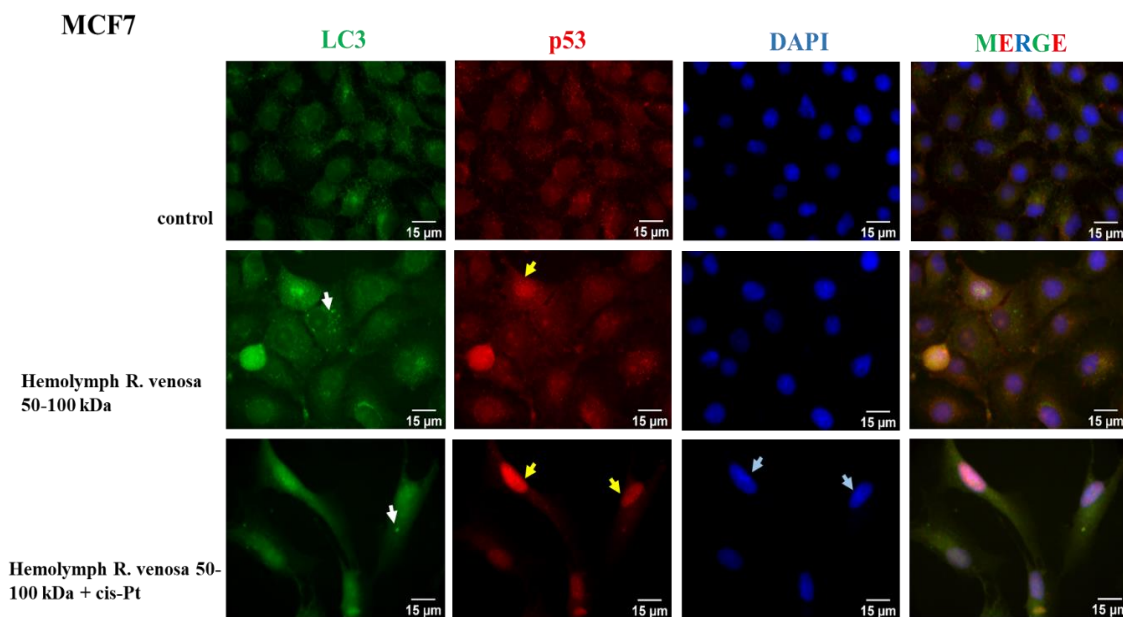
Онкологичните заболявания се характеризират с висока честота и смъртност и имат важно здравно и социално въздействие. През последните години много съединения, изолирани от различни природни източници, като растения и безгръбначни (както наземни, така и водообитаващи), представляват голям интерес за изследването на ракови заболявания. Много биоактивни съединения, изолирани от хемолимфата на различни видове мекотели, привличат значителен интерес като добри кандидати за терапевтични приложения. Някои от тях проявяват противотуморна активност и имат антиоксидантни и имуномодулиращи свойства. Група съединения с обещаваща противоракова активност са хемоцианините - олигомерни гликометалопротеини, пренасящи кислород в хемолимфата на членестоноги и мекотели.

Настоящото изследване има за цел да оцени *in vitro* антитуморната активност на биоактивни съединения, изолирани от хемолимфата на *Rapana venosa* (фракции на хемолимфата с различно молекулно тегло, както и структурните субединици на хемоцианина - RvH I и RvH II) срещу различни туморни клетъчни линии – белодробни, кожни, рак на маточната шийка, рак на млечна жлеза. Полу-максималната инхибиторна концентрация (IC₅₀) на биологично активните екстракти е получена от експериментално получена крива.

Нашите експерименти показаха, че хемолимфната фракция с молекулно тегло 50-100 kDa има значителен цитотоксичен ефект върху раковите клетки. Сходен ефект се наблюдава и при изоформата на хемоцианина RvH I. Установихме също, че тези две активни съединения имат потенциален синергичен ефект в комбинация с класически химиотерапевтични лекарства, широко използвани в онкологията – цис-платина и тамоксифен.



Фигура 1. Експериментално получени криви на ракови и неракови клетки, третирани хемолимфна фракция от *Rana venosa* (50-100 kDa, тъмночервена линия), в комбинация с цис-платина (яркочервена линия) или тамоксифен (розова линия), или RvH I субединица на хемоцианин (тъмно синя линия), в комбинация с цис-платина (яркосиня линия) или тамоксифен (светлосиня линия).



Фигура 2. Имунофлуоресцентен анализ на MCF-7 контролни клетки (първи панел), клетки, третирани с IC50 на хемолимфна фракция (50-100 kDa) (втори панел) и с IC50 на цис-платина в комбинация с IC25 на хемолимфната фракция от *Rana venosa* (трети панел), който показва локализацията на p53 (в червено) и образуване на LC3-пункти (в зелено). Ядрата са оцветени в синьо (DAPI).

Благодарности: Авторите изказват своята благодарност на МОН за финансовата подкрепа по Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“, одобрена с РМС №658 от 14.09.2018 г., договор ДО1-217/30.11.2018 и споразумения ДО1-323/18.12.2019 и ДО1-358/17.12.2020.

ИЗСЛЕДВАНЕ НА СИНЕРГИЧЕН ЦИТОТОКСИЧЕН ЕФЕКТ МЕЖДУ СТАНДАРТНИ ХИМИОТЕРАПЕВТИЦИ И ЕКСТРАКТИ ОТ *RAPANA VENOSA*, ВЪРХУ КЛЕТЪЧНИ ЛИНИИ ОТ РАК НА ГЪРДАТА

Александър Цинцаров¹, Мария Петрова¹, Златина Влахова¹, Людмила Велкова²,
Александър Долашки², Павлина Долашка², Ива Угринова¹

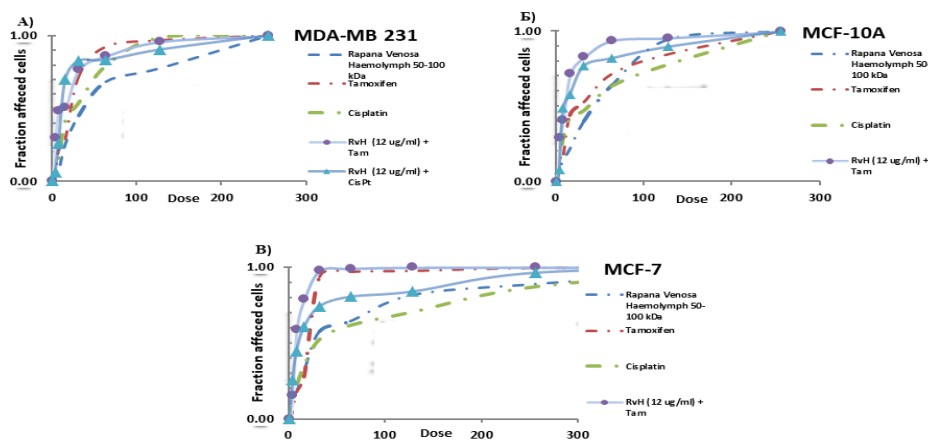
¹Институт по молекулярна биология „Академик Румен Цанев“, Българска академия на науките, ул. Акад.Г.Бончев, бл. 21, София 1113

²Институт по органична химия с Център по фитохимия, Българска академия на науките, ул. Акад.Г. Бончев, бл. 9, София 1113

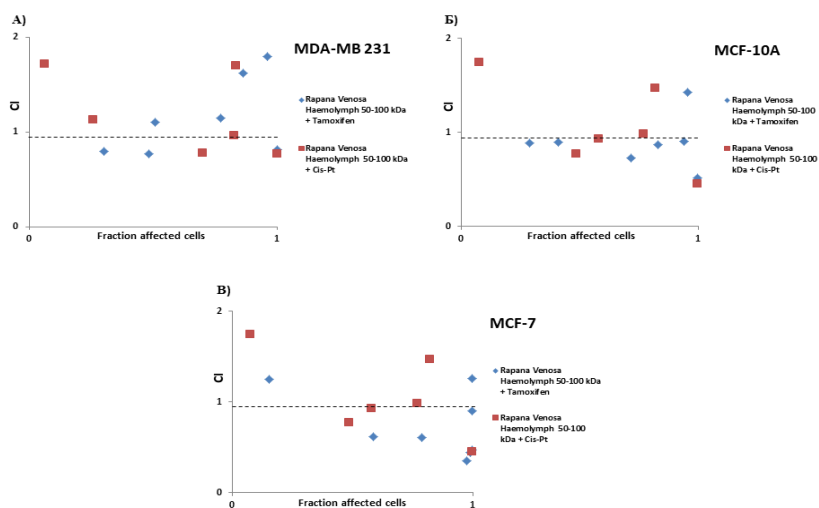
Ключови думи: природни продукти, хемоцианини, анти-туморна активност, комбинативен индекс (CI)

Раковите заболявания са проблем, с който човечеството се сблъсква все по-често в последните десетилетия. Голяма част от проучванията в областта са насочени към намирането на нови лекарствени форми с по-ниска токсичност към организма на пациента. Веществата, изолирани от природни източници (микроорганизми, растения, гъби или животни) попадат във фокуса на такива изследвания поради това, че немалка част от тях демонстрират значително цитотоксично действие срещу туморни клетки в *in vitro* условия, като понякога това действие е по-слабо към нетрансформирани клетъчни линии. Природните екстракти притежават много разнообразни структури и начини на действие върху клетките. Известна част от тези вещества са открити в морски организми. Представители на тази група са хемолимфата и хемоцианините в нея, изолирани от охлюва *Rapana venosa* – инвазивен вид, който обитава българското черноморие. Предишни изследвания на екстракти от *R. venosa* показват наличие на цитотоксично действие срещу някои ракови клетъчни линии в *in vitro* условия, като то се явява по-слабо отколкото действието на някои класически химиотерапевтици. Това дава основание за изследване на действието на тези екстракти и влиянието им върху противораковата терапия в по-голяма дълбочина. Данни за други природни екстракти с цитотоксично действие доказват, че комбинирането им с лекарства, прилагани в лечението на ракови заболявания, би могло да доведе до намаляване на активната доза на химиотерапевтиците, което би намалило страничните ефекти от терапията. Целта на това изследване е да оцени възможния синергичен цитотоксичен ефект между молекулна фракция от хемолимфа с маса 50-100 kDa, изолирана от *R. venosa*, и два химиотерапевтични агента, използвани в клиничните терапии – тамоксифен и цисплатина. В изследването са използвани три клетъчни линии - MDA-MB-231 (тройно негативен рак на млечна жлеза), MCF-7 (позитивен по рецептор за естроген рак на млечна жлеза) и MCF-10A (нетрасформиран епител от млечна жлеза). Влиянието на избраните вещества върху клетките, поотделно и в комбинация, е изследвано чрез МТТ тест. От изследването са получени стойности за полумаксималната концентрация на инхибиране на клетъчната пролиферация (IC₅₀) (**Фиг.1**). В допълнение тези данни са изследвани чрез метода на Chou-Talalay за анализ на комбинирано цитотоксично действие, като са получени стойности за комбинативен индекс и индекс на намаляне на дозата

(Фиг.2). Данните сочат наличие на синергичен цитотоксичен ефект между изследваните вещества и познатите химиотерапевтици.



Фиг.1. Криви на клетъчната пролиферация след третиране на клетките от линиите MDA-MB 231 (А), MCF-10A (Б) и MCF-7 (В), с хемолимфа, изолирана от *R. venosa* с маса 50-100 kDa, тамоксифен и цисплатина, поотделно и в комбинация. Данните посочват понижаване на IC50 при комбинираното третиране.



Фиг.2. Графики, показващи изменението на комбинационния индекс (CI) при третиране на клетки от линиите MDA-MB 231 (А), MCF-10A (Б) и MCF-7 (В) с комбинации от 12 $\mu\text{g/ml}$ хемолимфа от *R. venosa* с маса 50-100 kDa и вариращи концентрации на тамоксифен и цисплатина. Стойностите демонстрират наличие на синергизъм при сходни диапазони на тестваните концентрации.

Благодарности: Авторите изказват своята благодарност на МОН за финансовата подкрепа по Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“, одобрена с РМС №658 от 14.09.2018 г., договор ДО1-217/30.11.2018 и споразумения ДО1-323/18.12.2019 и ДО1-358/17.12.2020.

ПРОТЕИНОВ ПРОФИЛ НА БОЛЕСТТА НА АЛЦХАЙМЕР ПРИ СКОПОЛАМИНОВ МОДЕЛ НА ПЛЪХ С ПРИЛОЖЕНИЕ НА ЕКСТРАКТ ОТ ОХЛЮВИ КАТО НЕВРОПРОТЕКТИВНО СРЕДСТВО

Венцеслав Атанасов¹, Людмила Велкова¹, Любка Танчева², Александър Долашки¹,
Рени Калфин², Павлина Долашка¹

¹*Институт по Органична Химия с Център по Фитохимия, Българска Академия на
Науките, Г. Бончев 9, 1113 София*

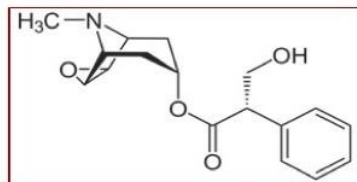
²*Институт по Невробиология, Българска Академия на Науките, София*

Ключови думи: Болест на Алцхаймер (БА), екстракт от охлюви, мозъчни протеини от плъхове, невропротективен ефект, скополамин.

Болестта на Алцхаймер (БА) е най-разпространеното невродегенеративно разстройство. Скополаминът е често използван агент за индукция на Алцхаймер при опитни животни. Използвахме скополаминов модел за оценка на потенциалния невропротективен ефект на екстракта от градински охлюв *Helix aspersa* върху невродегенеративни процеси *in vivo*. Използвани са мъжки половозрели опитни плъхове. Те бяха разделени на три групи: контролна група от здрави плъхове, скополаминова група (третирана със скополамин) и експериментална група, третирана едновременно със скополамин и екстракт от охлюви. Изолирани бяха две основни мозъчни структури, свързани с паметта (хипокамп и префронтална кора). Получените протеини бяха разделени чрез SDS - PAGE и бяха анализирани с MALDI-MS. Използвайки MASCOT Peptide Mass Fingerprint[®] и софтуер IQTL[®], кората и хипокампаалните протеини бяха идентифицирани и сравнени.

Благодарности: Авторите изказват своята благодарност на МОН за финансовата подкрепа по Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“, одобрена с РМС №658 от 14.09.2018 г., договор ДО1-217/30.11.2018 и споразумения ДО1-323/18.12.2019 и ДО1-358/17.12.2020.

Скополаминов модел на БА при плъх:

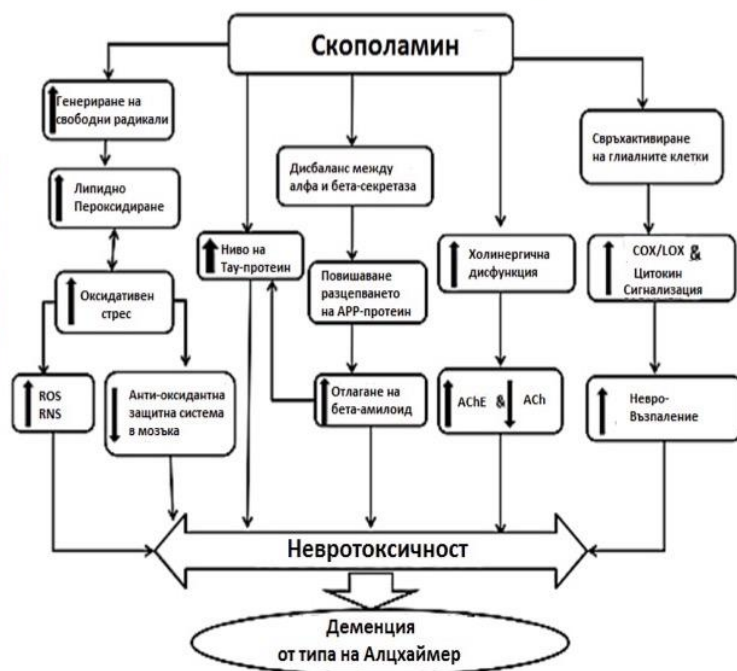
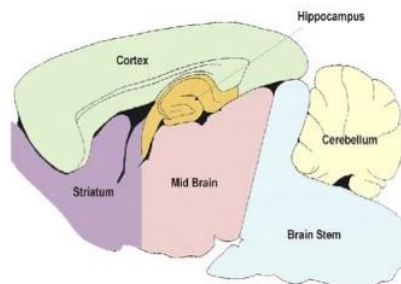


Скополамин



Скополамин - индуцирана деменция от Алцхаймер тип при плъх

Схема на основните Зони в мозъка на плъх



ТЕСТ ЗА ФОТОТОКСИЧНОСТ НА ПРИРОДНИ ПРОДУКТИ

Инна Суликовска¹, Елена Иванова¹, Искра Янкова¹, Людмила Велкова²,
Александър Долашки², Павлина Долашка², Иван Илиев¹

¹*Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей,
Българска академия на науките, София 1113*

²*Институт по органична химия с Център по фитохимия, Българска академия на науките,
ул. Акад.Г. Бончев, бл. 9, София 1113*

Ключови думи: фототоксичност, LED слънчев симулатор, *in vitro* тест за безопасност

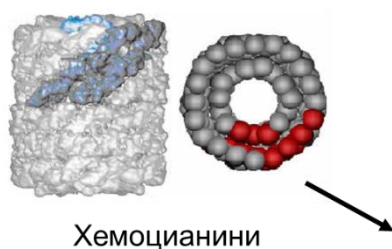
Оценката за безопасност на химични субстанции и природни продукти, които ще бъдат включени в лекарства или козметични препарати, е от съществено значение за избягване на странични ефекти и нежелани реакции. Дадено вещество се определя като фототоксично, ако след облъчване със слънчева светлина се активира, в резултат на което се образуват активни форми на кислорода и високореактивни свободни радикали, токсични за организма. В последните години скринингът за фототоксичност при *in vitro* условия е важна и утвърдена стъпка при разработването и оценката за приложимост на нови вещества в клинични и козметични продукти. Поради това нараства актуалността на приложението на нови високоефективни изкуствени слънчеви симулатори на основата на LED технологията.

Целта на настоящото изследване е оценка на приложимостта на LED слънчев симулатор при *in vitro* тест за безопасност на продукти със синтетичен и природен произход.

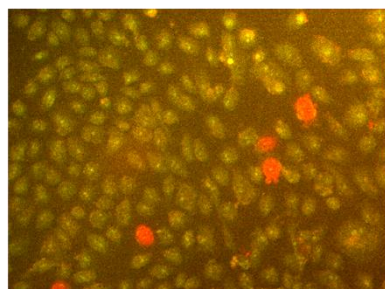
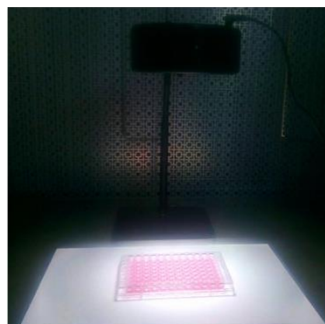
Изследвахме спектрофотометричните характеристики на LED слънчев симулатор със спектрометър с разделителна способност 0.03 nm. За определяне на светлинната мощност използвахме PM 100D със сензор S120VC. Изкуственият слънчев симулатор беше тестван в лабораторни условия върху добре охарактеризирани за фототоксичност съединения: акридин оранж, радахлорин и етерично масло от здравец. Определянето на цитотоксичност / фототоксичност беше извършено чрез BALB/c 3T3 Neutral Red Uptake Assay.

Нашите резултати показаха сходство между спектрофотометричните характеристики на изследвания LED слънчев симулатор и слънчевата светлина. Проведените биологичните тестове показаха висока ефективност на изкуствения слънчев симулатор при *in vitro* условия за тестване на фототоксичност.

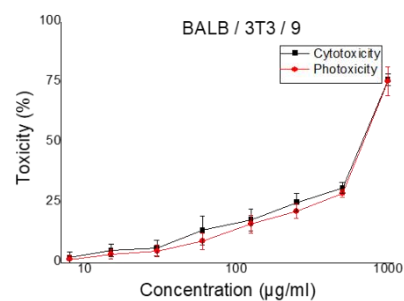
В настоящото изследване беше извършено успешно валидиране на LED слънчев симулатор и тестовете за приложимост дадоха основание за неговата употреба в експерименти за определяне на фототоксичност на хемоцианини и техните производни, изолирани от *Helix lucorum*, *Helix aspersa* и *Rapana venosa*.



LED слънчев симулатор



ФОТОТОКСИЧНОСТ



Благодарности: Авторите изказват своята благодарност на МОН за финансовата подкрепа по Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“, одобрена с РМС №658 от 14.09.2018 г., договор ДО1-217/30.11.2018 и споразумения ДО1-323/18.12.2019 и ДО1-358/17.12.2020.

БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ВЕЩЕСТВА - ЦИТОТОКСИЧНО И ПОТЕНЦИИРАЩО ДЕЙСТВИЕ

Кристина Малинова¹, Елена Кръчмарова¹, Геновева Начева¹, Людмила Велкова²,
Александър Долашки², Венцеслав Атанасов² и Павлина Долашка²

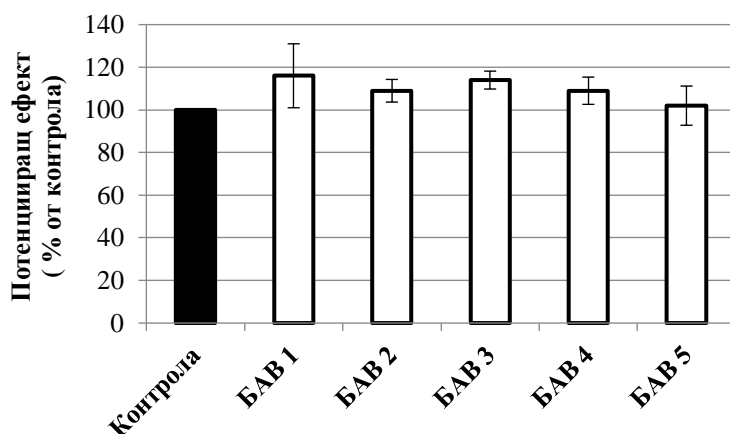
¹Институт по молекулярна биология „Академик Румен Цанев“, Българска академия на науките

²Институт по органична химия с център по фитохимия, Българска академия на науките

Ключови думи: хемоцианин, hIFN γ , WISH клетъчна линия, цитотоксичен ефект, потенциращо действие

Редица биологично активни вещества (БАВ) намират широко приложение в превантивната медицина заради благоприятния си ефект върху организма. Сред тях са пептиди от слюз и хемоцианини, изолирани от различни видове молюски. Основната характеристика, която причислява слюзта като БАВ е неговата антимикробна активност, а за хемоцианините е показано, че притежават хемолитична, антимикробна, антивирусна и антитуморна активност, наблюдавана при ракови клетки от карцином на пикочния мехур, дебелото черво, естроген зависим и независим рак на гърдата, рак на панкреаса и простата.

За да изследваме потенциращото действие на нискомолекулни фракции от слюз, хемоцианин и неговите изоформи от два вида градински охлюви, морски охлюв и крайбрежен рак върху биологичната активност на човешки интерферон-гама (hIFN γ), първоначално определихме минималните нетоксични концентрации (МНК) върху WISH клетъчна линия. Трансформираните анеуплоидни WISH клетки са получени от човешки амниотичен епител и комбинират характеристиките на нормални амниотични клетки с ракови клетки на шийката на матката. Подбраните концентрации бяха използвани при изследването на потенциращото действие на БАВ чрез модифициран кинуренинов тест, основаващ се на антипролиферативната активност на hIFN γ . На Фиг. 1 са посочени тези БАВ, които показват потенциращо действие.



Фиг. 1. Потенциращо действие на БАВ. БАВ 1 - Дисоцииран на субединици хемоцианин от *Carcinus aestuarii* (CarHc); БАВ 2 - Субединица RvH I от *Rapana venosa*; БАВ 3 - Слиз от *Helix aspersa* 1- 10 kDa; БАВ 4 - Слиз от *Helix aspersa* 1- 3 kDa; БАВ 5 - Слиз от *Helix aspersa* над 30 kDa; Контрола – клетки, третирани с 15 ng/ml hIFN γ .

Чрез проведените изследвания върху WISH клетъчна линия, за пръв път беше показано потенциращото действие на нискомолекулни фракции от слуз на *Helix aspersa* и *Carcinus aestuarii*, и хемоцианини изолирани от *Rapana venosa* върху биологичната активност на hIFN γ . Този ефект е най-високо изявен при дисоциирания на субединици хемоцианин от крайбрежен рак *Carcinus aestuarii* и слюзта от *Helix aspersa* 1-10 kDa, което ги нарежда сред БАВ, като сериозни кандидати за съвместно приложение с антивирусни препарати за стимулиране на Т-клетъчния имунитет при лечение на заболявания причинени от херпесни и други вируси. Получените данни ще послужат като основна информация за бъдещи изследвания на взаимодействието между hIFN γ и БАВ с цел изясняване на потенциращото им действие.

Благодарности: Авторите изказват своята благодарност на МОН за финансовата подкрепа по Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“, одобрена с РМС №658 от 14.09.2018 г., договор ДО1-217/30.11.2018 и споразумения ДО1-323/18.12.2019 и ДО1-358/17.12.2020.

ФЕРОЦЕНОВИ ПРОИЗВОДНИ КАТО КАНДИДАТИ ЗА АНТИРАКОВА ТЕРАПИЯ

Ивайло Славчев^{*1}, Георги Добриков¹, Ива Угринова²

¹*Институт по Органична Химия с Център по Фитохимия, Българска Академия на Науките, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 9, София 1113*

²*Институт по молекулярна биология, Българска академия на науките, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 21 София 1113*

**Email: ivailo.slavchev@orgchm.bas.bg*

Органометалната химия и биохимията са обединени през последните две десетилетия в ново поле – биоорганометална химия. Фероценовите съединения играят значителна роля в тази област, особено след като първото производно на фероцена с противоракова активност е докладвано през 1984 от Коерф-Майер [1].

Разгледани са класически примери на фероценови производни с антиракова активност. Описан е синтеза на нови (+)-камфорови производни, съдържащи сулфонамидни групи и фероценилметилиденови фрагменти. Получените вещества са тествани срещу различни ракови клетъчни линии, както и нормални човешки клетъчни линии, за да се определи тяхната активност и избирателност срещу злокачествените клетки. Има ясна тенденция, която показва, че наличието на фероценилметилиденова група е от съществено значение за цитотоксичността, като различните сулфонамидни заместители могат да променят активността.

Благодарности: Това изследване е финансирано от Министерството на Образованието и Науката на Република България чрез национална програма „Млади учени и постдокторанти“, одобрена от DCM # 577/17.08.2018.

Литература:

[1] P. Koepf-Mayer, H. Koepf, E. W. Neuse, Angew. Chem. Int. Ed., **1984**, 23, 456-457.

ПРОТИВОТУМОРНИ СВОЙСТВА НА НОВОСИНТЕЗИРАН ФЕРОЦЕН-
СЪДЪРЖАЩ КАМФОР СУЛФОНАМИД ПРИ КЛЕТЪЧНИ МОДЕЛИ НА РАК НА
МЛЕЧНА ЖЛЕЗА И БЯЛ ДРОБ

Мария Шрьодер^{1*}, Мария Петрова¹, Йордана Тодорова¹, Георги Добриков², Петър Петров³, Ива Угринова¹

¹ *Институт по молекулярна биология, Българска академия на науките, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 21, София 1113*

² *Институт по Органична Химия с Център по Фитохимия, Българска Академия на Науките, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 9, София 1113*

³ *Институт по полимери - Българска академия на науките, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 103-А, София 1113*

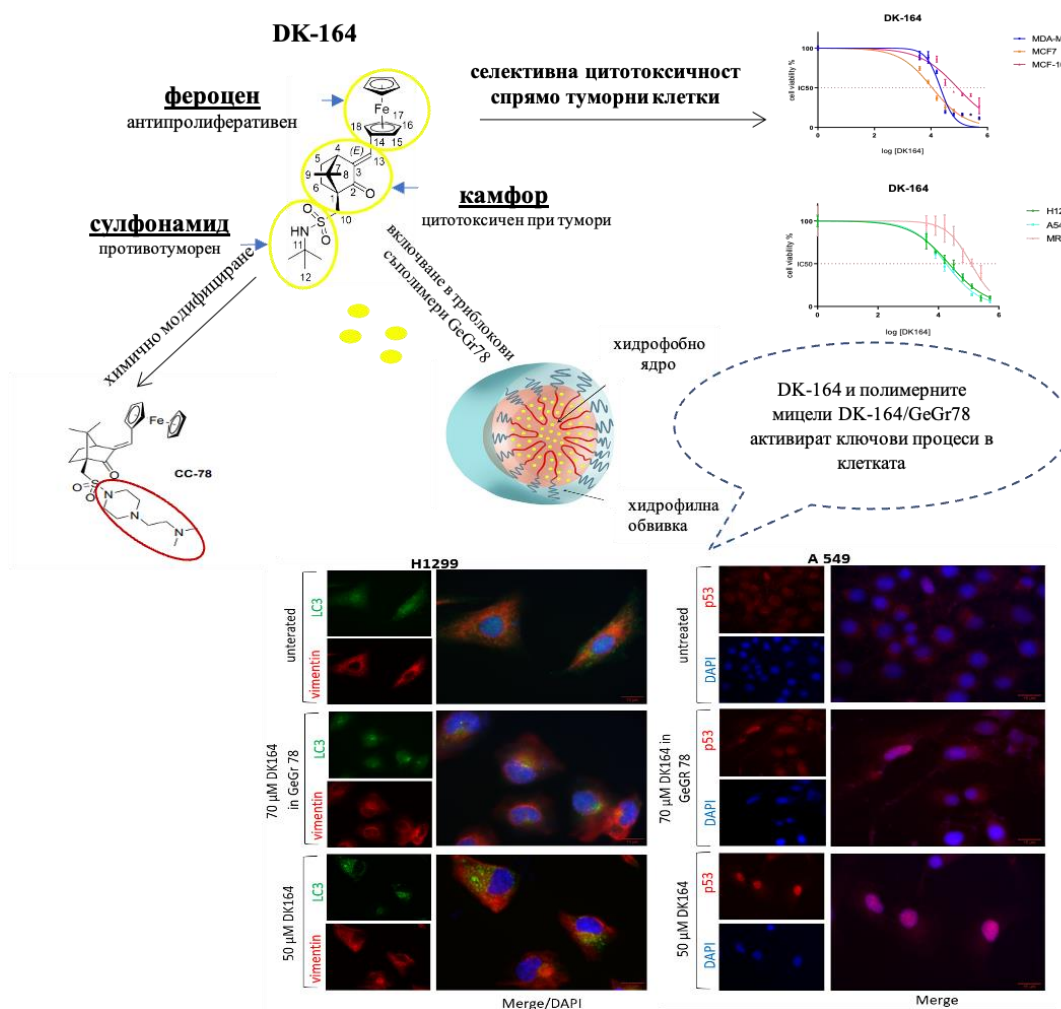
*e-mail: marias82@abv.bg

Броят на онкоболните в световен мащаб расте с всяка изминала година. Въпреки че химиотерапията е златен стандарт при лечението на рак, прилагането на познатите химиотерапевтици често е свързано с нежелани странични ефекти или развитие на лекарствена резистентност. Това прави търсенето и разработването на нови противоракови лекарствени системи един от главните приоритети на съвременната биомедицина. Трансформацията на нормални клетки в злокачествени новообразувания е сложен процес, в който участват различни молекулни механизми. Вещества, съдържащи няколко функционални групи в една молекула и включени в съвременни полимерни системи за доставяне на биомолекули, биха могли целенасочено да повлияят различни регулаторни пътища в клетката и да постигнат синергичен ефект.

Цел на това изследване е да се характеризират молекулните механизми на действие на ново-синтезиран фероцен-съдържащ камфор-сулфонамид 1-((1S,4S)-3-((E)-ferrocenylmethylidene)-7,7-dimethyl-2-oxobicyclo[2.2.1]heptan-1-yl)-N-(tert-butyl) methanesulfonamide (ДК-164) върху клетъчни модели от рак на млечна жлеза и недребноклетъчен рак на бял дроб, както и да се подберат подходи за разработването на подходяща лекарствена система с помощта на оригинални синтетични стратегии от областта на органичната и полимерната химия.

За оценяване на ефикасността на ДК-164 проследихме неговия ефект върху ключови клетъчни процеси като клетъчна пролиферация, клетъчен цикъл, апоптоза и автофагия при две клетъчни линии от рак на млечна жлеза- MCF7 и MDA-MB-231, две линии от недребноклетъчен рак на бял дроб- H1299 и A549-, както и при нераковите контролни линии MCF-10 и MRC5. Резултатите от МТТ-тест за цитотоксичност и клоногенен анализ показаха изразено противотуморно действие на ДК-164 в раковите клетки и по-ниска токсичност в контролните клетки. Апоптотичните и автофагични процеси предизвикани от ДК-164 анализирахме съответно чрез двойно оцветяване с annexin V/PI и отчитане на формираните LC3-puncta. Чрез флуоцитометричен анализ установихме, че IC50 на изследваното вещество предизвиква задържане на клетъчния цикъл във фаза G1 и активира програмирана клетъчна смърт (апоптоза) във всички ракови линии до 24 часа след третирането.

Наблюдаваните ефекти бяха по-изразени в линиите MCF-7 и A549, които съдържат функционален белтък p53. С помощта на имунофлуоресцентни техники и Western Blot установихме промяна в динамиката на ключовите регулаторни белтъци p53 и NFkB в третирани клетки. С цел подобряване на бионаличността на базовото вещество и разтворимостта му във физиологична среда и за използване на предимствата на колоидните системи за доставяне на биомолекули, ДК-164 беше включено в нови блоксополимерни мицели и биологичната активност на получените конюгати беше доказана в серия от експерименти.



Благодарности: Авторите изказват своята благодарност на МОН за финансовата подкрепа по Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“, одобрена с РМС №658 от 14.09.2018 г., договор ДО1-217/30.11.2018 и споразумения ДО1-323/18.12.2019 и ДО1-358/17.12.2020 и на ФНИ проект ДН11/16 18.12.2017

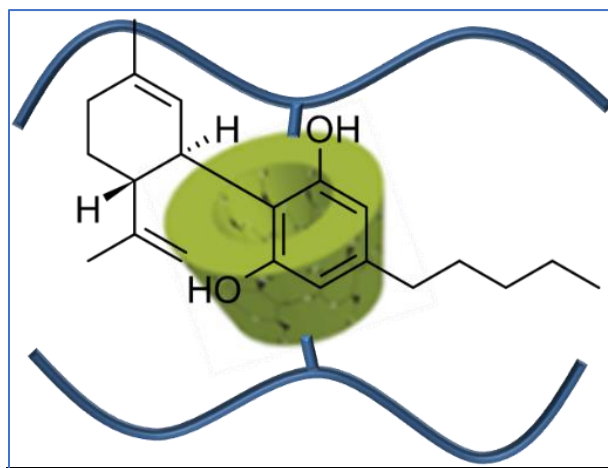
ПОЛИЗАХАРИДНИ КРИОГЕЛНИ НОСИТЕЛИ, СЪДЪРЖАЩИ β -ЦИКЛОДЕКСТРИН ЗА ДОСТАВЯНЕ НА КАНАБИДИОЛ

Явор Данов¹, Деница Момекова², Петър Д. Петров¹

¹ *Институт по полимери - Българска академия на науките, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 103-А, София 1113*

² *Фармацевтичен факултет, Медицински университет - София*

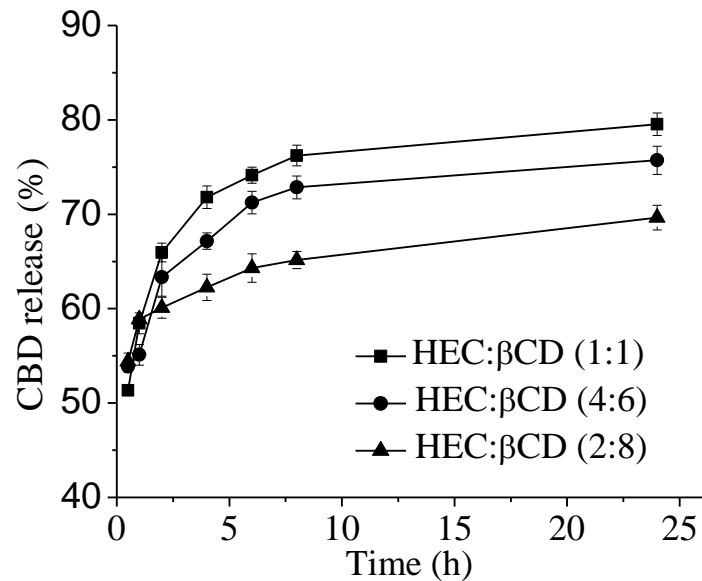
Полизахаридните хидрогелове са перспективни материали за различни приложения в медицината и фармацията поради тяхната хидрофилност, биосъвместимост, биоразградимост и ниска токсичност. Те представляват интерес за разработване на системи за контролирано доставяне на биологично активни вещества. Докладът представя резултати от синтеза на криогелни носители на основа на 2-хидроксиетилцелулоза (HEC) и цикличния олигозахарид β -циклодекстрин (β -CD), проектирани за контролирано доставяне на канабидиол (CBD). Чрез комбиниране на криогенно третиране и фотохимично омрежване са получени криогелове с различен състав. Установено е, че материалите с високо съдържание на β -CD (от 100 до 400 % спрямо масата на HEC) се характеризират с висока еластичност, супер-макропореста структура и висока степен на набъбване. Включването на β -CD-ви звена в полимерната мрежа позволява натоварване на CBD посредством комплексообразуване от типа “host-guest” между CBD и хидрофобната кухина на β -CD (Фигура 1).



Фиг. 1. *Схематично представяне на комплекс от типа “host-guest” между CBD и хидрофобната кухина на β -CD.*

HEC/ β -CD криогелове с различен състав (1:1; 4:6 и 2:8 масови части) са натоварени с канабидиол посредством оригинален метод, след което са определени профилите на освобождаване при 35 °C в ацетатен буфер (pH 5,5). Методът на натоварване позволява поставяне на желано количество CBD в обема на криогела. Изчисленият капацитет на натоварване на носителите е в границите от 25 до 30 %. Криогелът с най-високо съдържание на β -CD в полимерната мрежа се характеризират с най-ниска скорост на освобождаване (Фигура 2). Наблюдаваното бързо освобождаване на част от вещество (около 50%) в

първите минути на експеримента най-вероятно се дължи на наличие на свободен CBD (извън β -CD-та чашка).



Фиг. 2. Профили на освобождаване на CBD от криогелни носите с различен състав при 35 °C в ацетатен буфер (pH 5,5).

Благодарности: Авторите изказват своята благодарност на МОН за финансовата подкрепа по Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“, одобрена с РМС №658 от 14.09.2018 г., договор ДО1-217/30.11.2018 и споразумения ДО1-323/18.12.2019 и ДО1-358/17.12.2020.

ЕФЕКТ НА КАНАБИДИОЛ (CBD) ВЪРХУ БЕЛОДРОБНИ КЛЕТЪЧНИ ЛИНИИ

Лазар Лазаров, Мария Петрова, Анастас Господинов, Ива Угринова

*Институт по молекулярна биология, Българска академия на науките, ул. Акад.Г.Бончев,
бл. 21, София 1113*

Ключови думи: канабидиол (CBD), белодробен рак, апоптоза, некроза, p53, репликация

Канабидиолът е един от над 100 канабиноида, съдържащи се в растението *Cannabis Sativa* и има разнообразни и комплексни биологични свойства. Това вещество въздейства на множество процеси в клетката, които са обект на интензивни изследвания повече от десетилетие. За разлика от повечето канабиноиди, CBD се характеризира с малък афинитет към рецепторите от ендоканабиноидната система и няма психоактивни свойства. Канабидиолът бива използван в лечението на множество болести, включително ракови заболявания. Въпреки множеството проучвания върху антитуморната му активност, голяма част от молекулните механизми, свързани с този му ефект са все още неизвестни.

Целта на нашето изследване е да бъде изучен и оценен антипролиферативен и проапоптотичен ефект на CBD посредством *in vitro* експерименти. За тази цел ние използвахме две недребноклетъчни белодробни ракови линии – A549 (експресиращи p53) и H1299 (p53 - негативни). За измерване на цитотоксичността на CBD бе използван МТТ тест. Проапоптотичният ефект бе околичествен чрез Annexin V FACS анализ и имунофлуоресцентно детектиране на активацията на Cas 3/7. С тези методи установихме, че съществува концентрационно зависимо увеличение на броя апоптотиращи клетки при p53 позитивните A549 (Фиг.2. А). Количеството клетки в апоптоза при p53 негативните H1299 (Фиг.2 В) е значително по-ниско, но въпреки това общата клетъчна преживяемост при двете линии е сходна. Причината за това е нарастването на броя некротирични клетки при линията H1299. Също така открихме, че при третиране на линията A549 с CBD се наблюдава концентрационно зависимо понижение на репликацията. Това бе доказано и околичествено чрез “click” - реакция с EdU и последвало фиксиране и имунофлуоресцентно оцветяване с анти тяло за фосфорилирания γ H2AX.

Благодарности: Авторите изказват своята благодарност на МОН за финансовата подкрепа по Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“, одобрена с РМС №658 от 14.09.2018 г., договор ДО1-217/30.11.2018 и споразумения ДО1-323/18.12.2019 и ДО1-358/17.12.2020.

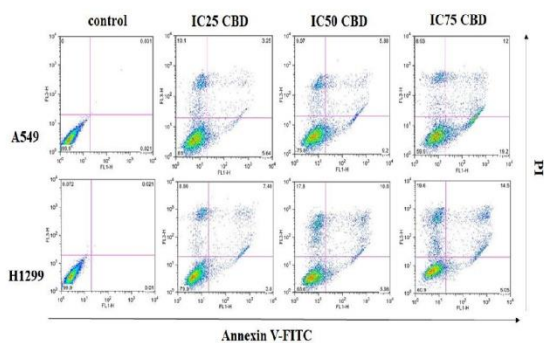


Fig.1. Детекция на апоптоза с FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit-клетки от двете ракови линии бяха третирани с три различни концентрации на CBD (IC25, IC50, IC75). Апоптотичните клетки бяха идентифицирани посредством нарастването на интензитета на флуоресцентния сигнал на белязания Annexin V, а популацията от некротични клетки беше обособена чрез нарастване на флуоресцентния сигнал от PI.

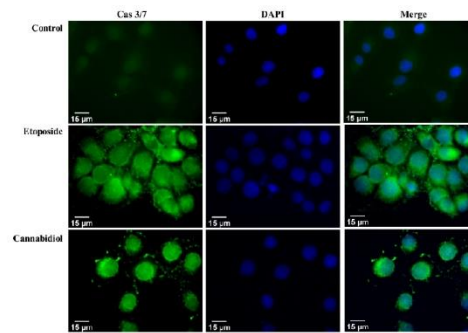
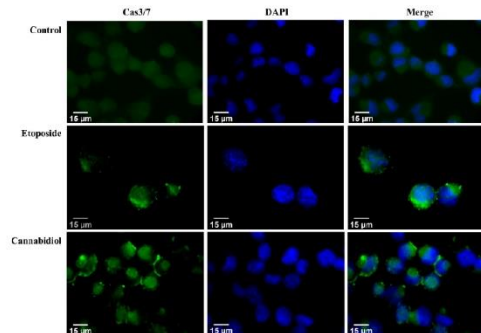


Fig.2. А Клетъчна линия A549 с активирани Cas 3/7 след третиране с канабидиол и етопозид (позитивна контрола). Клетките са третирани с концентрация от 10 μM канабидиол и 120 μM етопозид (химиотерапевтик предизвикващ апоптоза). В. Клетъчна линия H1299 с активирани Cas 3/7 след третиране с канабидиол и етопозид (позитивна контрола). Клетките са третирани с концентрация от 10 μM канабидиол и 200 μM етопозид (химиотерапевтик предизвикващ апоптоза).

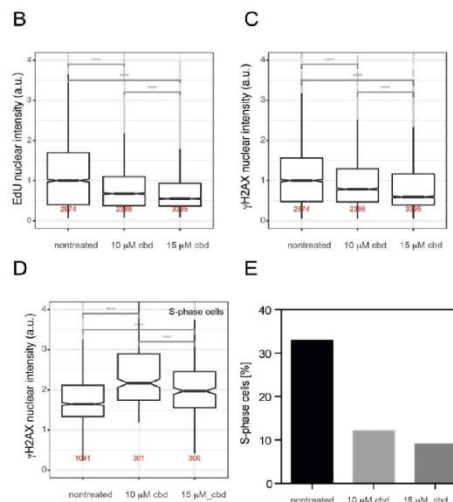
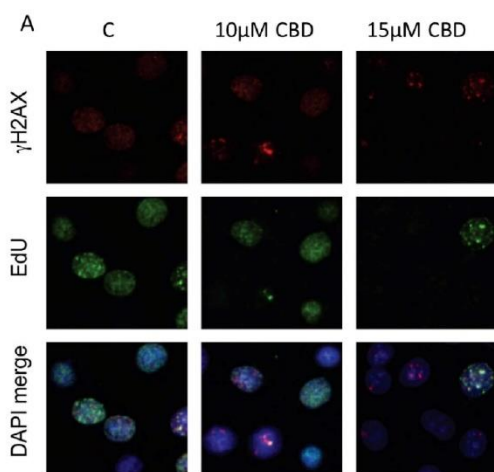


Fig.3 Третирането на линията A549 с канабидиол (10 μM ; 15 μM) води до рязък спад в нивото на репликацията. (А) Контролни и третирани с канабидиол клетки белязани с 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU), оцветени с антияло за γH2AX и активирани с "click" реакция с Alexa fluor 488-azide. (В) Графично изобразен интензитет на EdU оцветяване на S-фазни ядра при контролни и третирани с канабидиол клетки. (С) Графично изобразен интензитет на γH2AX оцветени ядра изобразяващ промяна в размера на ядрата след третиране с канабидиол. (D) Разпределение на интензитета на γH2AX оцветени ядра, представено като Tukey boxplots. (E) Графично представяне на процент S-фазни клетки при контролни и третирани с канабидиол клетки.

АНТИТУМОРНА АКТИВНОСТ НА ВЛАКНЕСТИ МАТЕРИАЛИ, СЪДЪРЖАЩИ КВЕРЦЕТИН

Ани Георгиева¹, Николета Стоянова², Мария Спасова², Невена Манолова², Илия Рашков², Ренета Тошкова¹, Светлозара Петкова¹

¹*Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей,
Българска академия на науките*

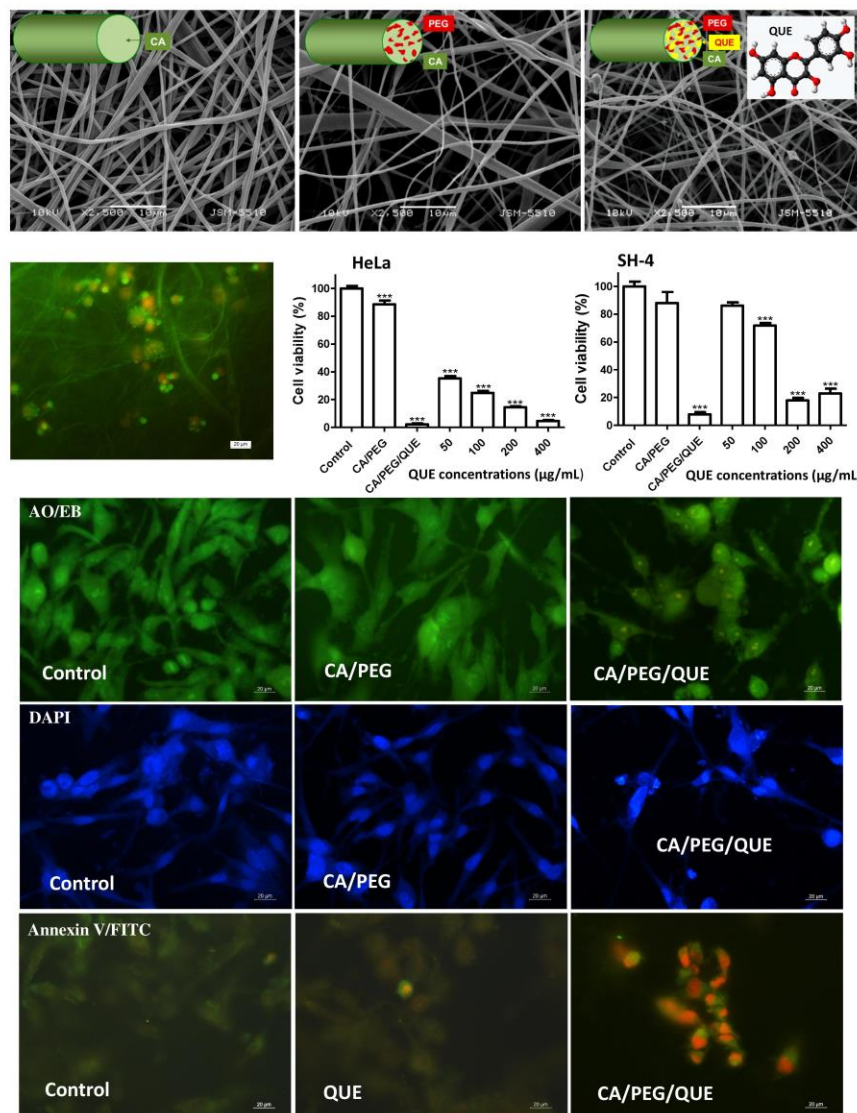
²*Институт по полимери, Българска академия на науките*

Растенията са ценен източник на биологично активни съединения като фенолни съединения, терпени, алкалоиди и др. Кверцетинът е растителен флавоноид, който се съдържа, в големи количества, в различни видове растения. Той притежава комплекс от ценни свойства: антиоксидантни, противовъзпалителни, антибактериални и анти tumorни. Поради ограничената му разтворимост във вода, някои от тези свойства трудно могат да бъдат проявени. Обещаващ подход за преодоляване на това ограничение е включването на биологично активното съединение в подходящи микро- и нановлакнести полимерни носители, получени чрез електроовлажняване [1]. Съставът на полимерната матрица трябва да бъде избран така, че да бъде постигнато подобро освобождаване на кверцетин от влакната, като по този начин се увеличава неговата бионаличност и ефективност.

Целта на настоящото изследване е да се оцени анти tumorната активност на оригинални влакнести материали, съдържащи целулозен ацетат и полиетиленгликол, натоварени с природното биологично активно съединение - кверцетин. Като експериментална моделна система в изследването бяха използвани човешки tumorни клетъчни линии от цервикален карцином (HeLa) и кожен меланом (SH-4). Жизнеността и пролиферативната активност на tumorни клетки, култивирани в присъствие на кверцетин-съдържащите полимерни материали, бяха изследвани чрез МТТ тест. Цитоморфологичните промени, настъпили в tumorните клетки в резултат от контакта с кверцетин-съдържащите влакнести материали бяха анализирани чрез флуоресцентна микроскопия, след оцветяване с акридин оранж и DAPI. За установяване на способността на материалите да предизвикват апоптоза в tumorните клетки беше приложено флуоресцентно оцветяване с анексин V/FITC. Проведените *in vitro* изследвания показаха, че новите полимерни материали предизвикват значително намаляване на жизнеността и пролиферацията на tumorните клетки и механизмът на тяхната анти tumorна активност включва индуциране на апоптоза.

Получените резултати разкриват кверцетин-съдържащите влакнести материали като обещаващи кандидати за биомедицински и фармацевтични приложения.

Антитуморна активност на нови полимерни материали, получени чрез електроовлажняване от целулозен ацетат (CA), съдържащи полиетиленгликол (PEG) и природно биологично активно съединение – кверцетин (QUE)



Благодарности: Авторите изказват своята благодарност на МОН за финансовата подкрепа по Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“, одобрена с РМС №658 от 14.09.2018 г., договор ДО1-217/30.11.2018 и споразумения ДО1-323/18.12.2019 и ДО1-358/17.12.2020.

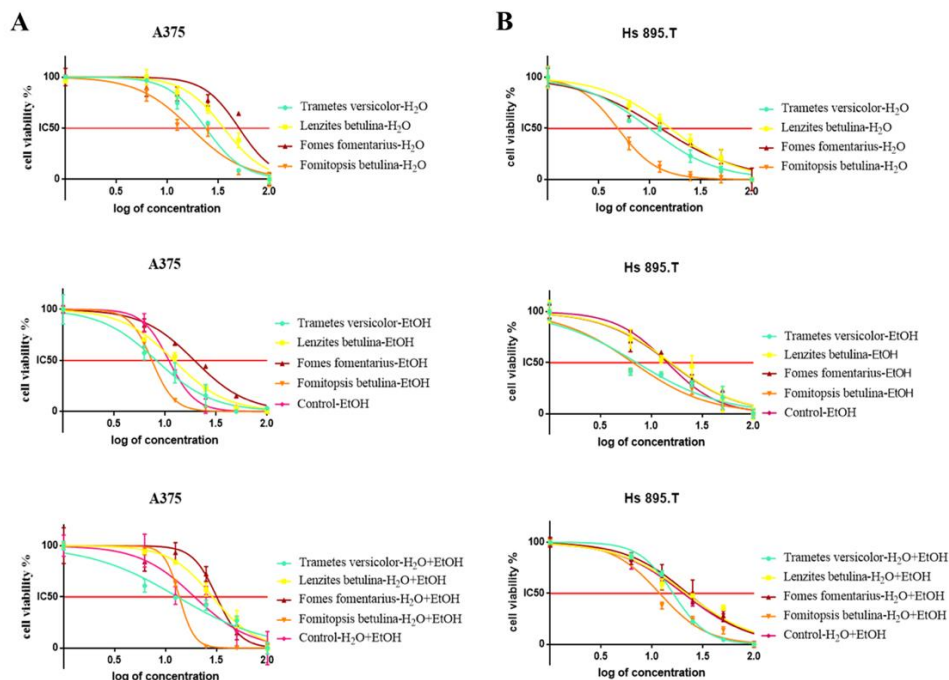
ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПРОТИВОТУМОРНИЯ ПОТЕНЦИАЛ НА ЕКСТРАКТИ ОТ НЯКОИ ВИДОВЕ БЪЛГАРСКИ ГЪБИ

Александър Душков, Мария Петрова, Ива Угринова

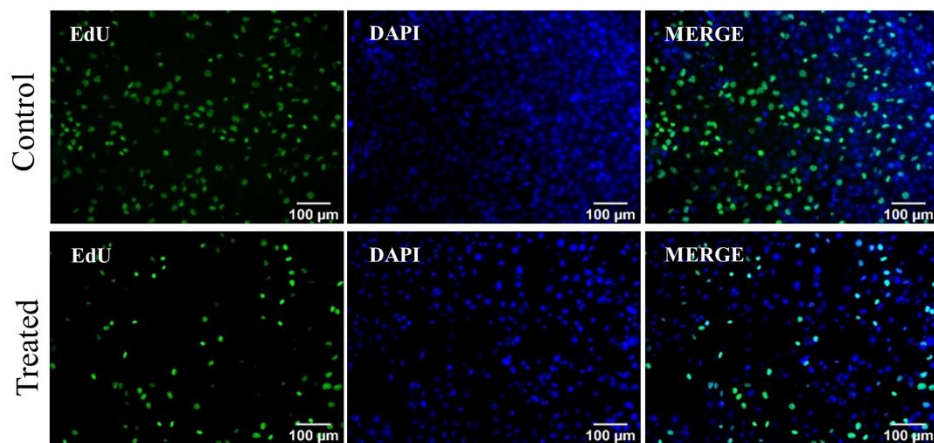
*Институт по молекулярна биология, Българска академия на науките, ул. Акад.Г.Бончев,
бл. 21, София 1113*

Ключови думи: ракови клетки, гъби, противотуморни вещества, пролиферация, цитотоксичност

Диворастящите български гъби отдавна са обект на интерес в качеството си на хранителни деликатеси; в страната се срещат множество ядливи видове, които се търсят и ценят от любители и професионалисти. Въпреки това, за разлика от много видове билки, не би било неточно да се твърди, че българските гъби към момента не фигурират като потенциален източник на лекове за различни заболявания в общественото съзнание, навярно поради липсата на установена „народна“ традиция за ползването им по този начин, каквато присъства отдавна в някои страни от Централна и Източна Азия. Тъй като в България се срещат много от най-високо оценяваните лечебни видове гъби от тези части на света, а и с оглед на растящото количество литературни сведения сред научните публикации, които потвърждават биологичната активност на различни екстракти, приготвени от гъбите, нашият екип сметна за уместно да проведе оценяване на противотуморната активност на екстракти от изсушени екземпляри от български видове гъби, използвайки клетъчни култури от ракови клетки с различен произход като моделни системи. В хода на изследването бяха използвани водни и етанолни екстракти от четири вида дървесни гъби от природен резерват Витоша (*Trametes versicolor*, *Lenzites betulina*, *Fomes fomentarius* и *Fomitopsis betulina*), приготвени в нашата лаборатория, както и етанолен извлек от червена мухоморка (*Amanita muscaria*), осигурен ни с любезното съдействие на г-н Владимир Въжаров. Цитотоксичният ефект на екстрактите бе установен чрез МТТ тест. С екстракта от *A. muscaria*, поради забележително високата му цитотоксичност, бяха проведени и експерименти, целящи да установят наличието или отсъствието на ефект върху пролиферативната способност на клетките чрез включване на 5-етинил-2'-дезоксинуридин; в допълнение, клетки от линиите H1299 и PC3 бяха обработени с етинилуридин и бромонуридин след третиране с екстракт от *A. muscaria* с цел установяване на наличието на стресови РНК гранули. Резултатите ни сочат към различни нива на цитотоксичност между различните типове екстракти, както и за висока биологична активност на екстракта от *A. muscaria* върху ракови клетки *in vitro*; екипът е на мнение, че данните са обещаващи и добре демонстрират големия потенциал на българските диворастящи гъби като иновативни добавки към противотуморните терапии.



Фиг.1. MTT тест за цитотоксичност, проведен с водни и етанолни екстракти от дървесните гъби *T. versicolor*, *L. betulina*, *F. fomentarius* и *F. betulina* върху клетки от човешки меланом A) от линията A375 и B) от линията Hs.895.T.



Фиг.2. Експеримент за включване на 5-етинил-2'-дезоксуридин върху клетки от линията H1299 след третиране с екстракт от *A. muscaria* в продължение на 48 часа.

Благодарности: Авторите изказват своята благодарност на МОН за финансовата подкрепа по Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“, одобрена с РМС №658 от 14.09.2018 г., договор ДО1-217/30.11.2018 и споразумения ДО1-323/18.12.2019 и ДО1-358/17.12.2020.

ИЗСЛЕДВАНЕ НА СТРУКТУРНИ ПРОМЕНИ В МЕМБРАННАТА ДИНАМИКА ПОД ДЕЙСТВИЕТО НА АНТИТУМОРНИ ЛИПИДИ

Ирина Георгиева¹, Веселина Узунова¹, Петя Иванова², Албена Момчилова¹, Румяна Цонева¹

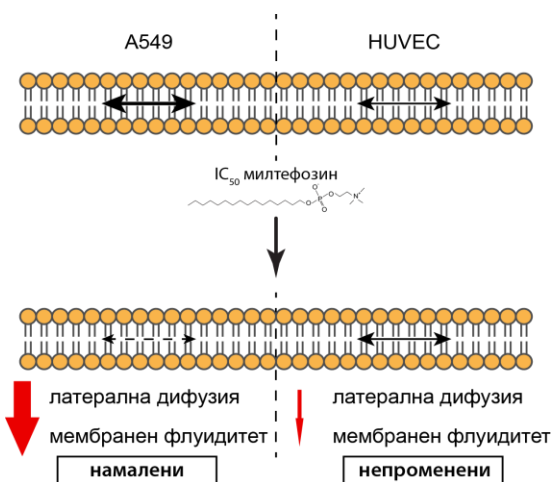
¹Институт по Биофизика и Биомедицинско инженерство – БАН

²Институт по Невробиология – БАН

Увод: Алкилфосфохолините (АФХ) са анти tumorни липиди, селективни към ракови клетки^{1,2}, и действащи върху клетъчната мембрана, а не върху ядрото на клетката, което ги отличава от конвенционалните цитостатици^{3,4}. Клетъчните мембрани са динамични структури, отговорни за поддържането на цялостта на клетката, нейната организация и функция. АФХ повлияват липидния метаболизъм и клетъчната

сигнализация чрез взаимодействието си с липидните рафтове⁴. Целта на настоящето изследване е проследяване на динамиката (изменението във флуидитета) на клетъчни мембрани под действието на АФХ. Беше сравнен мембранный флуидитет на клетки от човешки белодробен карцином – A549 и от човешки ендотелни клетки от пъпна връв – HUVEC, като моделни системи на ракови и неракови клетъчни линии, съответно, под действието на милтефозин (представител на АФХ)⁵.

Материали и методи: Изследвахме ефекта на IC₅₀ на милтефозин (HePC) за 24ч. върху мембранный флуидитет на A549 и HUVEC, чрез: 1) определяне на флуоресцентната анизотропия (ФА) посредством белязане с TMA-DPH; и 2) флуоресцентно възстановяване след фотоизбелване (FRAP) след маркиране на мембрани с фузогенни липозоми от DOTAP : DOPE : DiD⁶. TMA-DPH променя флуоресценцията си в зависимост от ориентацията на молекулата спрямо лъча на възбуждане (ефект на ФА) и флуоресцира само след вграждане в мембраната, като високата анизотропия отговаря на по-ригидна мембрана⁷. Методът позволява да се изследва голяма клетъчна популация наведнъж, но изисква клетките да са в суспензия, което е недостатък на метода при работа с адхезионни клетъчни култури. Експериментите с FRAP се извършват върху адхезирални клетки чрез флуоресцентна спининг диск конфокална микроскопия в условия *in vivo* (37°C, 5% CO₂), която предлага оптимални физиологични условия за клетките. Чувствителността на метода е много по-висока, но при него се анализират сравнително по-малък брой клетки едновременно. За целта, клетъчните мембрани се маркират флуоресцентно с фузогенните липозоми и участък от мембраната се облъчва до пълната загуба на флуоресценция, след което се засича времето на възстановяване на сигнала на същото място. От кинетиката на



възстановяване се изчислява дифузионния коефициент, който е показател за степента на мембранната организация.

Резултати и дискусия: Под действието на милтефозина мембраните на раковите клетки търпят промяна във флуидитета си за разлика от нераковите клетки. Данните от FRAP анализа показват значително намаляване на дифузионния коефициент в клетки A549 след третиране с IC₅₀ милтефозин (от $0.735 \pm 0.322 \mu\text{m}^2/\text{s}$ на $0.334 \pm 0.126 \mu\text{m}^2/\text{s}$; $p < 0.0001$), докато подобни промени са минимални при клетки HUVEC (контрола - $0.380 \pm 0.043 \mu\text{m}^2/\text{s}$; IC₅₀ HePC - $0.298 \pm 0.059 \mu\text{m}^2/\text{s}$; $p < 0.05$). Този ефект не се отчете посредством измерването на ФА с багрилото ТМА-DPH. Въпреки оптимизиране на метода, той се оказва не достатъчно чувствителен за тези изменения.

Извод: Милтефозинът намалява мембранный флуидитет в раковата клетъчна линия A549, което води до увеличаване на подредеността на мембраните правейки ги по-ригидни. Този ефект не се наблюдава при нераковата клетъчна линия HUVEC. Настоящите резултати допринасят за разбирането, че механизмът на действие на алкилфосфохолините (милтефозина) е свързан с въздействието им върху биофизичните свойства на липидните мембрани в раковите клетки.

Благодарности: Настоящото изследване бе възможно, благодарение на ННП „Млади учени и пост-докторанти“, модул "Млади учени", МОН и КП-06-НЗ1/16, ФНИ; както и на Българския център за съвременна микроскопия към ИМБ (Euro-Bioimaging, Sofia node).

Използвана литература:

1. Gajate, C., & Mollinedo, F. *Current Drug Metabolism* **3**, 491–525 (2002).
2. Pehlivanova V., et al. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **27**, 3695-3699, (2013)
3. Kostadinova A., et al. *Advances in protein chemistry and structural biology* **101**, 27-66, (2015)
4. van Blitterswijk, W. & Verheij, M. *Curr. Pharm. Des.* **14**, 2061–2074 (2008).
5. Uzunova, V. et al. *Chem. Biol. Interact.* **310**, 108731 (2019).
6. Kleusch, C., Hersch, N., Hoffmann, B., Merkel, R. & Csiszár, A. *Molecules* **17**, 1055–1073 (2012).
7. do Canto, A. M. T. M. et al. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1858**, 2647–2661 (2016).

МОРФОМЕТРИЧНО ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА ЧЕРВЕНИ КРЪВНИ КЛЕТКИ, СВЪРЗАНО С РАННА ЗАГУБА НА ПЛОДА. РОЛЯ НА КЛЕТЪЧНОТО СТАРЕЕНЕ

Ариана Лангари¹, Величка Стрижкова², Сашка Крумова¹, Августина Данаилова¹, Ина Гьошева³, Светла Тодинова¹

¹ *Институт по Биофизика и биомедицинско инженерство, Българска академия на науките, ул. Акад. Георги Бончев, бл.21, 1113 София*

² *Институт по Оптични материали и технологии "Акад. Йордан Малиновски", Българска академия на науките, ул. Акад. Георги Бончев, бл 109, 1113 София*

³ *Университетска акушеро-гинекологична болница "Майчин дом", 2 ул. Здраве., София*

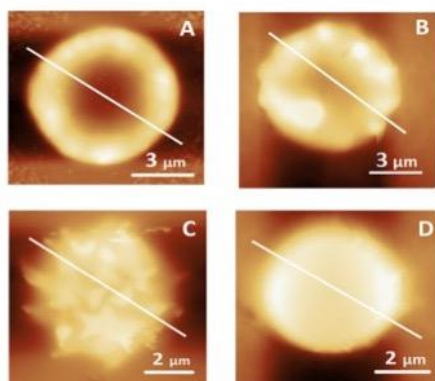
Ключови думи: червени кръвни клетки, силова атомна микроскопия, клетъчно стареене, ранна загуба на плода

Развитието на процеса на стареене на червените кръвни клетки (ЧКК) при здрави индивиди и пациенти със заболявания е от съществен научен интерес. Червените кръвни клетки играят важна биологична роля при транспорта на газове, поддържането на реологията на кръвта и кръвния поток. Тези характеристики силно зависят от стадия на стареене, в който клетките се намират. Морфологията на ЧКК, както и грапавостта на тяхната мембрана са свързани с функционалния статус на клетките и са важни маркери за здравословното състояние. За това, изследването на морфометричните характеристики на еритроцитите в хода на стареенето им може да даде важна информация за различни патологични състояния.

В това изследване, комбинираме атомно-силова и оптична микроскопия, за да проследим ултраструктурните промени, които настъпват в хода на стареенето на червените кръвни клетки, изолирани от жени с ранна загуба на плода и здрави бременни жени и жени без установена бременност.

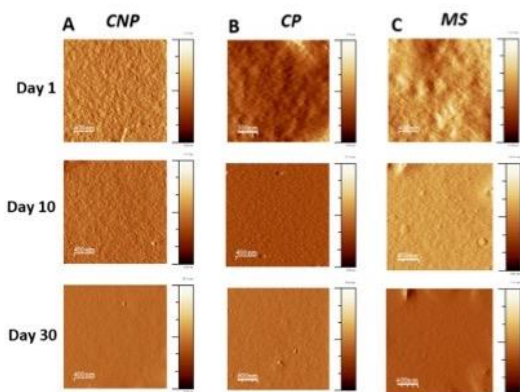
Морфологичният профил на свежо изолирани ЧКК от здрави бременни и жени без установена бременност до голяма степен е еднотипен. Наблюдава се типична двойно-вдлъбната форма при около 80% от тоталния брой клетки. Значителни промени във формата на еритроцитите се наблюдават в процеса на стареене. ЧКК преминават през различни морфологични типове, докато се стигне до крайния етап на стареенето - сфероцити. Паралелно с промяната на формата на ЧКК се наблюдава и намаляване на тяхната големината, което е съпроводено и с намаляване на грапавостта на мембраната им.

Ултраструктурните промени на ЧКК, изолирани от жените с ранна загуба на плода, настъпват много по-бързо в процеса на стареене на клетките в сравнение с двете контролни групи. Докато грапавостта на клетъчната мембрана на контролите, намалява линейно с течение на времето, при червените кръвни клетки изолирани от пациентки с ранна загуба на плода, грапавостта намалява експоненциално още на първите 10 дни и има много по-ниски стойности в сравнение с тези на двете контролни групи. В заключение, нашите данни демонстрират за първи път, че ранната загуба на плода е свързана със специфични промени във формата на ЧКК и грапавостта на мембраната им, които водят до по-ускорено стареене на клетките в сравнение с тези на здрави контроли.

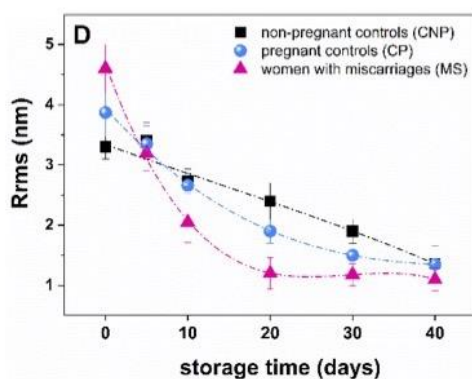


Фиг. 1. Типични (2D) изображения снети с помощта на атомно силова микроскопия на четирите морфологични класа еритроцити, в хода на тяхното стареене:

(A) еритроцити с двойно вдлъбната форма;
(B) еритроцити с назъбена форма;
(C) спикuloцити и (D) сфероцити.



Фиг. 2. Ултраструктурни промени на клетъчната мембрана на еритроцити, изолирани от изследваните групи жени (колони A – здрави жени без установена бременност; B – здрави бременни жени; C – пациентки с ранна загуба на плода) и количествено измерената стойност на грапавостта (R_{rms}) на плазмената мембрана (панел D), като функция от времето на съхранение на клетките.



Благодарности: Този проект е подкрепен с грант КР-06-Н21 / 4, „Конкурс за финансиране на фундаментални научни изследвания – 2018 г.”, Фонд Научни изследвания, България.

В тези изследвания е използвано оборудване на Разпределената научна инфраструктура ИНФРАМАТ, част от Националната пътна карта на България за научна инфраструктура, подкрепена финансово от Министерство на образованието и науката.

МЕТОДИ ЗА РЕГИСТРАЦИЯ НА МИКРОСКОПСКИ ИЗОБРАЖЕНИЯ

Румен Стаматов, Стойно Стойнов

*Институт по молекулярна биология, Българска академия на науките, ул. Акад.Г.Бончев,
бл. 21, София 1113*

Автоматичното проследяване на движението на обекти е често срещан и нетривиален проблем в широк набор от научни области. Програмирането на автономни превозни средства изисква автоматично проследяване на останалите участници в движението в реално време [1]. В молекулярната биологията, движението на флуоресцентно белязани белтъци често се анализира на базата на поредица от 2D или 3D изображения от микроскоп [2]. В медицината, движението или промяната във формата на вътрешните органи се определя от ултразвукови, рентгенови или магнитно-резонансни изследвания [3].

Много от наличните методи за автоматично следене са тясно специализирани за отделна задача, което ги прави неприложими за неспециалисти и специалисти в различна област. Друг недостатък на стандартните методи е силната им зависимост от много параметри, чието нагласяне изисква твърде много време и изчислителни ресурси.

Регистрацията е универсален метод, приложим във всяка задача, свързана със следене на обекти чрез изображения. Регистрацията представлява трансформиране на информацията (пикселите) от едно изображение, наречено движещо се, към друго – наречено фиксирано. Този метод традиционно се използва в медицината за деформация на единични изображения, намирайки съответствието им с вече известен референтен модел („атлас“). Например, снимка на мозъка на пациент се трансформира спрямо вече известен мозъчен атлас, така че да се установят различните структури, въпреки различното им местоположение.

Въпреки мощността на този метод, той все още се използва главно при съответствие на две изображения, а рядко за анализ на дълга последователност от снимки във времето. С тази презентация ще разкажа точно за такова приложение на регистрацията, при което всеки две съседни снимки се регистрират една спрямо друга, с цел следене на структури във времето. Ще се фокусирам върху пример от молекулярната биология – проследяване на клетъчни ядра, белязани с флуоресцентен маркер в 48-часови експерименти. Ще обърна внимание на различните видове регистрация – твърда, афинарна и еластична.

Благодарности: Авторите изказват своята благодарност на МОН за финансовата подкрепа по Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“, одобрена с РМС №658 от 14.09.2018 г., договор ДО1-217/30.11.2018 и споразумения ДО1-323/18.12.2019 и ДО1-358/17.12.2020.

Литература:

1. Zhang, XQ., Jiang, RH., Fan, CX. *et al.* Advances in Deep Learning Methods for Visual Tracking: Literature Review and Fundamentals. *Int. J. Autom. Comput.* **18**, 311–333 (2021)
2. Biophys J, 2015 Sep 1;109(5):883-91, doi: 10.1016/j.bpj.2015.07.013
3. S. Klein, M. Staring, K. Murphy, M.A. Viergever, J.P.W. Pluim, "elastix: a toolbox for intensity based medical image registration," IEEE Transactions on Medical Imaging, vol. 29, no. 1, pp. 196 - 205, January 2010

ТАКСОНОМИЧЕН И ФУНКЦИОНАЛЕН АНАЛИЗ НА ПОЧВЕНИЯ МИКРОБИОМ ПО КОНЦЕНТРАЦИОННИЯ ГРАДИЕНТ НА ЗАМЪРСЯВАНЕ С ТЕЖКИ МЕТАЛИ

Радина Николова, Галина Радева

Институт по молекулярна биология, Българска академия на науките, ул. Акад.Г.Бончев, бл. 21, София 1113

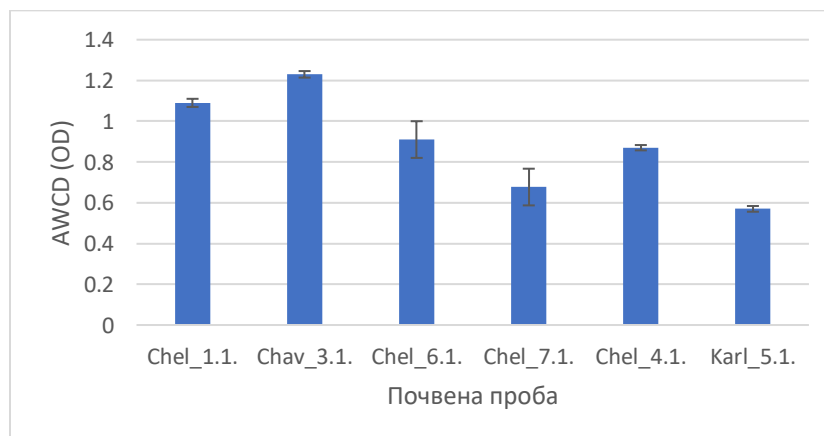
Един от основните замърсители на почвите в България вследствие на антропогенната дейност са тежките метали, а техните високи нива на натрупване повлияват негативно върху почвеното здраве, както и върху функцията и структурата на микробните съобщества.

Целта на изследването е да се установи функционалният потенциал и таксономичното разнообразие в почвени проби, взети по концентрационния градиент на замърсяване с Cu ($53\text{--}860\text{ mg kg}^{-1}$), Zn и Pb в района на Златишко-Пирдопската котловина, Западна България.

Пробите са взети от повърхностния слой (0-20 cm) от пет точки по моделна пътека на замърсяване както следва: Chel_1.1. < Chav_3.1. < Chel_6.1. < Chel_4.1. < Karl_5.1. Пробата Chel_1.1., чиято концентрация на тежки метали се изравнява с фоновото им съдържание, е използвана за контрола.

За целта на изследването са анализирани физико-химичните свойства и механичния състав на почвите, съдържанието на Cu, Zn, Pb (след разлагане в „царска вода – *aqua regia*“) и техните биодостъпни форми (екстрахиране с 0.01M CaCl₂). Физиологичният потенциал на почвените бактериални съобщества е определен чрез системата Biolog EcoPlates™. Таксономичният анализ на почвените проби е проведен чрез конструиране на 16S рДНК клонови библиотеки, амплифициране и секвениране на V3-V4 хипервариабилната област на 16S рРНК гена с платформа Illumina MiSeq.

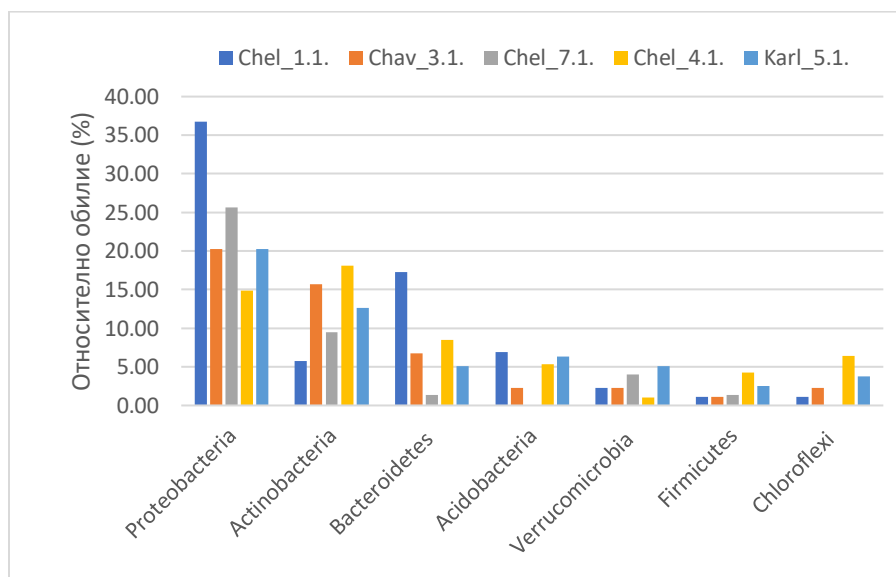
Резултатите от катаболизирането на въглерод-съдържащите субстрати, установени чрез показателя AWCD (average well color development), отразяващ тоталната микробна активност (Фиг.1) показват, че с най-нисък метаболитен потенциал се характеризира най-силно замърсената почвена проба Karl_5.1. ($0.57\pm0.014\text{ OD}$), а с най-висок – Chav_3.1. ($1.23\pm0.016\text{ OD}$), която не надвишава допустимите стойности на замърсяване.



Фиг. 1. Потенциал на бактериалните съобщества да усвояват въглеродни източници.

Катаболизирането на отделните въглеродни субстрати е сравнително равномерно при всички изследвани проби, като с нарастване на нивата на замърсяване се наблюдава по-засилено усвояване на карбоксилни киселини (СА) и аминокиселини (АА), което вероятно се обуславя от слабата резистентност на бактериалните съобщества.

Резултатите от анализа на таксономичното разнообразие на ниво отдел в бактериалните съобщества, чрез конструиране на 16S рДНК клонови библиотеки (Фиг.2), показват, че представителите на отдел *Proteobacteria* (20.22-36.78%) доминират във всички проби с изключение на проба Chel_4.1., където доминира отдел *Actinobacteria* (18.09%), следван от *Proteobacteria* (14.89%). *Actinobacteria* е вторият най-доминантен отдел при останалите проби, докато при контролата Chel_1.1. отдел *Bacteroidetes* се отличава с по-високо процентно разпределение (17.24%).



Фиг. 2. Относително обилие на бактериалните отдели на базата на 16S рДНК клонови библиотеки.

Таксономичното разнообразие на ниво клас показва, че най-доминантен е клас *Alphaproteobacteria* (11.39-18.39%) при всички проби с изключение на Chav_3.1, където доминира клас *Rubrobacteria* (11.24%) и Chel_7.1 – *Betaproteobacteria* (14.86%).

Идентифицирани са биоиндикаторни бактериални видове в най-замърсените с тежки метали проби: *Pseudomonas koreensis*, *Bradyrhizobium viridifuturi*, *Massilia aurea* (*Proteobacteria*), *Mycobacterium intracellulare*, *Terrabacter lapilli* (*Actinobacteria*), *Sporosarcina luteola*, *Bacillus niacini* (*Firmicutes*).

Резултатите от секвенирането на хипервариабилната област V3-V4 на 16S рРНК гена с платформа Illumina MiSeq потвърдиха доминирането на горе-посочените отдели и класове в бактериалните съобщества.

Благодарности: Авторите изказват своята благодарност на МОН за финансовата подкрепа по Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“, одобрена с РМС №658 от 14.09.2018 г., договор ДО1-217/30.11.2018 и споразумения ДО1-323/18.12.2019 и ДО1-358/17.12.2020 и на Фонд „Научни изследвания“, МОН; договор ДН11/4/14.12.2017.

ТЕРАГНОСТИЧНИ БИОМАРКЕРИ, АБСОРБИРАЩИ В БЛИЗКАТА ИЧ ОБЛАСТ

Атанас Курутос*, Георги Добриков

Институт по Органична Химия с Център по Фитохимия, Българска Академия на Науките, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 9, 1113, София

**Email: akouroutos@gmail.com*

Хидрониевият йон (или хидроний) H^+ изпълнява ключова роля в биологичните системи. Проследяването на процеси с киселинно-алкални сензори при променлива концентрация на H^+ е от съществено значение в областта на биомедицината. Разликите в стойностите на рН в различните части на тъканите и клетките оказват голямо влияние върху дейностите и нормалните функции на човешкото тяло. По този начин вътреклетъчното рН е жизненоважно за модулирането на органелните функции. рН на вътреклетъчните везикули (лизозоми, ендозоми и фагозоми), обикновено варира между 4.5 и 6.5. ^[1] Известно е също, че повишената киселинност на клетъчната среда е индикатор за наличие на различни патогенни състояния - например бъбречни болести, тумори, астма и муковисцидоза. ^[2,3] Следователно, разработването на нови сензори, способни на бързо и прецизно проследяване промените на рН в тъканите и клетките, е изключително вискателна задача.

През последните няколко години, използването на флуорофори абсорбиращи в близката ИЧ област (700-900 nm) придоби огромна популярност благодарение на техните уникални фотофизични свойства, свързани с важни съвременни биоаналитични анализи, като маркиране на клетъчни култури. ^[4,5] Indocyanine green (ICG) и неговите производни, също са приети за клетки и животински модели като фототермални реагенти (РТТ). ^[6]

Стириловите багрила са клас флуоресцентни, липофилни катиони които често се използват като митохондриални маркери, антибактериални средства, йонни сензори, както и мембранно-чувствителни агенти за изследване на клетъчната структура и нейната функция. ^[7,8] Афинитетът на някои стирилови молекули за визуализирането на клетъчни макромолекули като ДНК повдига въпросът за това какви структурни или физикохимични характеристики на тези молекули всъщност могат да предоставят специфична локализация на митохондриите и дали някои производни могат да бъдат разработени като маркери за други органели или макромолекули.

Благодарности към програмата на МОН "Млади учени и постдокторанти" за 2021 г., за финансирането на настоящите изследвания, по проект "Рационален синтез на стирилови багрила и приложение като потенциални платформи за биомаркиране".

Литература:

- [1] S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, *Chem. Commun.* **2007**, 2747.
- [2] F. L. M. Ricciardolo, B. Gaston, J. Hunt, *J. Allergy Clin. Immunol.* **2004**, 113, 610.
- [3] Y. Song, D. Salinas, D. W. Nielson, A. S. Verkman, *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **2006**, 290, C741.
- [4] T. Myochin, K. Kiyose, K. Hanaoka, H. Kojima, T. Terai, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 3401.
- [5] A. Kurutos, Y. Shindo, Y. Hiruta, K. Oka, D. Citterio, *Dyes Pigm.* **2020**, 181, 108611.
- [6] Q. Chen, X. Liu, J. Zeng, Z. Cheng, Z. Liu, *Biomaterials* **2016**, 98, 23.
- [7] W. Li, X. Yang, Q. Song, Z. Cao, Y. Shi, Y. Deng, L. Zhang, *Bioorganic Chemistry* **2020**, 97, 103707.
- [8] M. M. Sirim, V. S. Krishna, D. Sriram, O. Unsal Tan, *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, 188, 112010.

СЪЩНОСТ И БИОЛОГИЧНО ПРИЛОЖЕНИЕ НА МАС-СПЕКТРОМЕТРИЯТА

Павлина Долашка, Людмила Велкова и Александър Долашки

*Институт по органична химия с Център по фитохимия, БАН, ул. Акад.Г. Бончев, бл. 9,
1113 София*

Като един от най-чувствителните методи мас-спектрометрията се използва както за научни изследвания, така и в промишлеността.

Изобретател на първия апарат МАЛДИ-ТОФ е Танака през 1987, като сега науката разполага с голямо разнообразие на мас-спектрометри. Като най-популярни са Лазерната десорбционна йонизация с помощта на матрица (MALDI-TOF/TOF), Електроспрей-йонизационен мас-спектрометър (ESI-MS), като пробата се впръсква под налягане и преминава през сложни участъци от апарата, където претърпява редица промени.

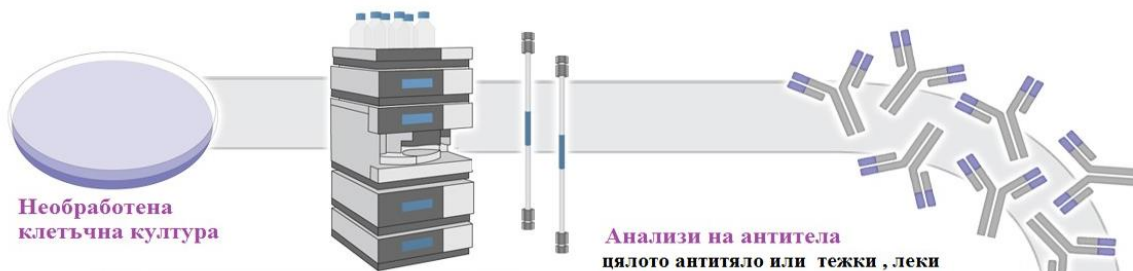
През последните две десетилетия тандем-мас-спектрометрите се превърнаха в едни от най-използваните аналитични техники, които включват не само стандартните анализатори, но и допълнително са свързани към различни хроматографски системи, като течен или газов хроматограф. Те намират приложение във все повече области, като:

- Анализи на околната среда;
- Биотехнологии: анализ на пептиди, протеини, олигонуклеотиди, гликопротеини;
- Фармацевтика: откриване и изследване на лекарствени вещества, фармакокинетика, лекарствен метаболизъм;
- Съдебна медицина: откриване на наркотици, експертизи и др.;
- Клинична лаборатория: анализ на хемоглобин, тестване на лекарства, допинг контрол.

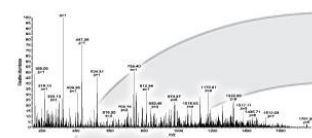
За анализи на пептиди и протеини предимно се използват комбинирани системи като: Q-TRAP-LC/MS/MS, ултра-високоэффективен течен хроматограф и масспектрометър (UHPLC-Qq/TOF) модел COMPACT, както и Orbitrap Elite Hybrid мас-спектрометър. Тези надеждни и чувствителни инструменти позволяват задълбочена характеристика на различни биотерапевтици и главно за анализ на антитела и фрагменти от тях. Позволяват идентифициране на стандартни пост-транслационни модификации, включително гликозилиране, гликиране, дезамидиране и окисление. Мас-спектрометрията е изключително универсална техника за протеомен и геномен анализ.

Synapt – High Definition MS (HDMS) е най-новото поколение мас-спектрометър за определяне на структурата на протеини, за анализ на метаболитни процеси, изобарно структурно идентифициране.

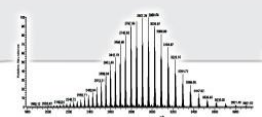
Благодарности: Авторите изказват своята благодарност на МОН за финансовата подкрепа по Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“, одобрена с РМС №658 от 14.09.2018 г., договор ДО1-217/30.11.2018 и споразумения ДО1-323/18.12.2019 и ДО1-358/17.12.2020.



Пречистване на антитела чрез 2D LC
афинитетно пречистване,
разделяне по заряда и др.



Topdown MS/MS на
антитяло, тежка верига,
лека верига и др.

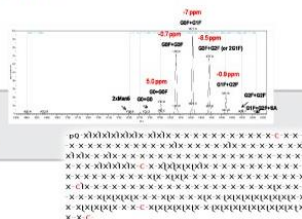


Пълен MS на цяло антитяло



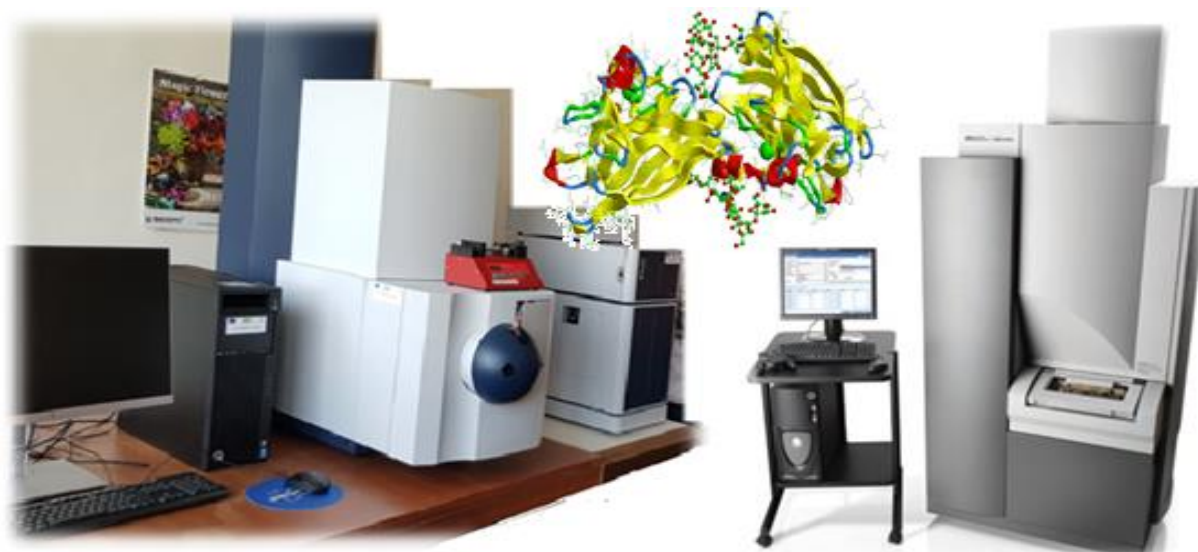
Анализи с LC-MS
Пробите са анализирани чрез LC-MS
на Orbitrap-базиран маспектрометър.

Автоматични анализи на данни
Автоматични анализи на данни
софтуери ProSightPC и Protein Dsicoverer.



Резултати

1. Точна молекулна маса на цялото антитяло.
2. Идентификация на гликоформи.
3. Идентификация на модификации на тежки/леки вериги.
4. Определяне на АКП на антитяло



ДВУИЗМЕРНА ГЕЛ ЕЛЕКТРОФОРЕЗА - УСПЕШЕН МЕТОД ЗА ОТКРИВАНЕ НА ПРОТЕИНИ В СМЕСИ

Людмила Велкова, Александър Долашки, Павлина Долашка

Институт по органична химия с Център по фитохимия, БАН, ул. Акад. Ул. Г. Бончев, бл. 9, 1113 София

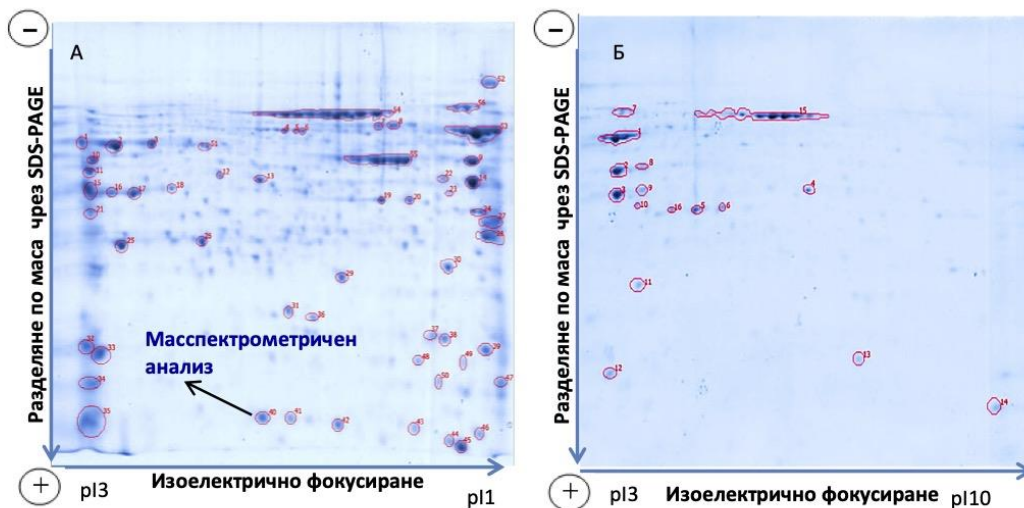
Двудименсионалната гел-електрофореза (2D-E) е уникален метод за анализ на сложни протеинови смеси, което позволява анализ на стотици, дори хиляди протеини. Методът е комбинация от изоелектрично фокусиране (IEF) и натриев додецил сулфат полиакриламиден гел електрофореза (SDS-PAGE). Поради голямото разнообразие от видове и източници на протеини, оптималната подготовка на пробите трябва да бъде определена емпирично за всеки конкретен случай. В най-добрия случай процедурата води до пълно разтваряне, разделяне, денатуриране и редукция на протеините в пробата. Първата дименсия е изоелектрично фокусиране (IEF), при която протеините се разделят по изоелектрична точка върху стрип с рН-градиент и приложен електрически потенциал. При втората дименсия, протеините се разделят според тяхното молекулно тегло на SDS-PAGE. Повече от 1000 протеина могат да бъдат разделени при използване на гелове с размер 10×10 cm при SDS-PAGE. За визуализиране на протеините петна могат да бъдат използвани Coomassie Brilliant Blue, silver stain, SYPRO Ruby и Deep Purple. Конвенционалната 2-DE е подходящ метод за откриване на денатурирани протеини в диапазона от 10 kDa до 200 kDa при рН 3.5-11.0, обаче все още е ограничено откриването на протеини с ниско молекулно тегло (<10 kDa), както и мембранни и силно хидрофобни протеини.

През последните години са разработени някои модифицирани 2-DE платформи за откриване на протеини. Преди да бъдат разделени по първото и второто измерение, протеините могат да бъдат белязани със спектрално съвместими флуоресцентни багрила, което води до много точно количествено определяне на протеините в различни биологични екстракти. Използването на софтуера Melanie™ Coverage 9 за анализ на 2D електрофореза дава информация за молекулното тегло (MW), изоелектричната точка (pI) и количественото разпределение на протеините. Тази информация може да бъде насочена към съществуващата база данни за съответните видове клетки, с цел получаване на първоначални данни. След предварителния софтуерен анализ на 2D-E, от гела се изрязват петната с промени в протеиновата експресия, които се обезцветяват с 50% ACN/25 mM NH_4HCO_3 , и след това се подлагат на протолитична хидролиза с трипсин за 24 часа при 37°C. Получените пептидни смеси от всяко протеиново петно се екстрахират с $\text{HCOOH}/50\%$ ACN. След лиофилизиране, пептиди те се разтварят и могат да бъдат идентифицирани чрез различни маспектрометрични методи, последвано от анализ чрез софтуера Mascot Server – Peptide Mass Fingerprint.

През последните години 2D-гел електрофореза е ключов инструмент за сравнителни изследвания в протеомиката.

Благодарности: Тази работа е подкрепена от Националната изследователска програма „Иновативни ниско токсични биоактивни системи за прецизна медицина (BioActiveMed)“, одобрена от ДСМ № 658/14.09.2018 г., финансирана от Министерството на образованието и науката на България и проект ДН 11/10 от 15.12.2017 г.

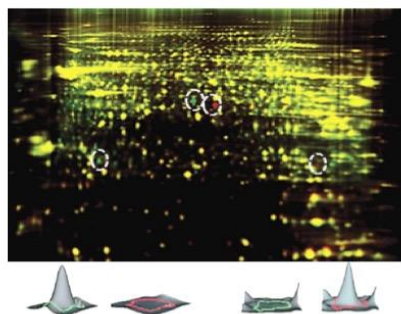
2D-гел електрофореза



Анализ на 2D-Е чрез софтуера Melanie™ Coverage 9

Spot No	Molecular weight [kDa]	mass[ug]	pI	volume [pixel]
1	61	0,053	5,2	4899
2	59	0,136	5,41	12659
3	60	0,031	5,65	2843
4	64	0,014	6,5	1339
5	64	0,019	6,62	1758
6	64	0,010	6,58	919
7	66	0,019	7,11	1768
8	66	0,039	7,2	3649
9	55	0,074	7,71	6856
10	55	0,027	5,28	2474
11	52	0,054	5,25	4995
12	51	0,016	6,09	1460
13	50	0,041	6,34	3804

Spot No	Molecular weight [kDa]	mass[ug]	pI	volume [pixel]
1	61	0,181	5,27	16812
2	51	0,082	5,27	7615
3	45	0,076	5,26	7092
4	46	0,016	6,52	1530
5	41	0,026	5,78	2446
6	42	0,009	5,95	880
7	69	0,025	5,3	2360
8	52	0,011	5,43	1055
9	46	0,016	5,43	1474
10	42	0,004	5,4	370
11	33	0,015	5,4	1392
12	29	0,018	5,22	1656
13	30	0,010	6,85	973
14	28	0,025	7,75	2361
15	68	0,311	6,29	28894
16	41	0,008	5,62	753



Анализ чрез 2Д-електрофореза на две протеинови проби, маркирани с различни флуоресцентни маркери CyDyes (Cy3 зелено и Cy5 червено), когато протеиновите петна се припокриват точно, се наблюдава оцветяване в жълто.

SDS-PAGE И 2D-PAGE АНАЛИЗ НА ХАПЛОИДНИ И ДИПЛОИДНИ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* КЛЕТКИ

Ася Даскалова¹, Людмила Велкова¹, Венцеслава Петрова², Анна Куюмджиева²,
Анна Томова², Павлина Долашка¹

¹ *Институт по органична химия с Център по фитохимия, Българска академия на науките,
1113, София*

² *Софийски университет „Св. Климент Охридски“, Биологически факултет, Катедра по
обща и индустриална микробиология, 1164, София*

Всеизвестен факт е, че по-голямата част от всички еукариотни организми прекарват естествения си живот в състояние на покой. *Saccharomyces cerevisiae*, като едноклетъчен гъбен микроорганизъм, е добре изучен еукариот със запазени основни клетъчни процеси. Ето защо се обръща по-специално внимание върху изследването на стационарната фаза на дрожди на *S. cerevisiae*.

Основният обхват на изследването е да се идентифицират основни ензими, експресирани в *S. cerevisiae*, участващи в отговора към оксидативен стрес индуциран с водороден пероксид (H₂O₂) и менадион (М) по време на стационарна фаза.

Сравнителните анализи чрез SDS PAGE техника, съчетана с MALDI-TOF/MS, са предназначени да търсят промени в експресията на протеини в хаплоидните (щам BY4741) и диплоидните (щам 584) *S. cerevisiae* клетки в състояние на покой. Предполагаемите ензими се определят чрез данни от MS и MS/MS, съобразени с базата данни Mascot - анализ на пръстови отпечатыци. На електрофорезата е отразена появата на ключови протеини отговорни за антиоксидантната защита към третираните с водороден пероксид диплоидни клетки. Интензивно е експресирана ивица при около 46 kDa, което се асоциира с метало-ензимната енолаза 2 (ENO 2), включена в гликолитичния цикъл. Ензимът алкохолна дехидрогеназа 1 (ADH 1) е доминиращо представена при около 36 kDa. В сравнение с диплоидните клетки, тези ензими са слабо експресирани в хаплоидните клетки, третирани с менадион или водороден прекис.

Допълнителни анализи чрез двуизмерна полиакриламид гел електрофореза (2 D SDS PAGE) бяха приложени за третираните и нетретираните хаплоидни клетки *S. cerevisiae*. Получените ивици се визуализират и анализират със софтуера за изображения Melanie 9™. По отношение на хаплоидните клетки в състояние на покой, повишеното регулиране на ензимите характеризира клетките на *S. cerevisiae*, подложени на оксидативен стрес. Предварителното изследване потвърждава присъствието на ADH 1 и ENO 2 в третираните с водороден пероксид хаплоидни клетки в сравнение с нетретираните клетки (контрола). По-нататъшни експерименти ще бъдат проведени с диплоиден щам 584 чрез 2 D SDS PAGE и с ESI Q TOF маспектрометричен анализ.

Дрождевата система показва перспектива за изследване на промените в състоянието на клетъчния окислител, както и в енергийната метаболитна активност в отговор на различни фактори на околната среда.

Благодарности: Тази работа е подкрепена от изследователски проект ДН 11/10 15.12.2017, финансиран от ФНИ на Министерството на образованието и науката в Република България.

Протеини определени от MS- и MS/MS спектри MASCOT

ПОЛЕЗНИ МОДЕЛИ И ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ТЕХНИКИ ОТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНАТА ХЕМАТОЛОГИЯ И ОНКОЛОГИЯ

Спиро Константинов

Фармацевтичен факултет, Медицински университет – София

Изолиране на фрагментирана ДНК от цитозола на апоптотични клетки, безклетъчна система за изследване на апоптозата, активационен статус на NF- κ B, формирање на колонии в полутвърда среда от нормални хемопоетични и малигнено трансформирани клетки, изолиране на липидни рафтове и други.

Благодарности: Авторите изказват своята благодарност на МОН за финансовата подкрепа по Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“, одобрена с РМС №658 от 14.09.2018 г., договор ДО1-217/30.11.2018 и споразумения ДО1-323/18.12.2019 и ДО1-358/17.12.2020 и на ФНИ проект ДН11/16 18.12.2017

ПРОТЕОМЕН И МИКРОАРЕЙ АНАЛИЗ В ОНКОФАРМАКОЛОГИЯТА

Антониос Трохопулос, Спиро Константинов

Фармацевтичен факултет, Медицински университет – София

Задълбоченият анализ на молекулярните процеси при дадена неоплазия е от решаващо значение, когато става въпрос за лечението ѝ. При протеомен анализ идентифицирането на протеини, които са необичайно свърхекспресирани или подекспресирани, насочва към това кои сигнални пътища са засегнати и най-вероятно отговорни за растежа и прогресията на тумора. Микроарей-анализът дава информация за такива промени на РНК ниво и по-точно свърхекспресирани или подекспресирани микроРНКи. В последните години много микроРНКи се използват като диагностични и прогностични биомаркери и/или терапевтични таргети. В този смисъл протеомният и микроарей анализ в онкофармакологията може да ни даде насока относно това кои антинеопластични лекарства могат да се окажат ефективни с крайна цел оптимизиране и индивидуализиране на антинеопластичните терапии.

Благодарности: Авторите изказват своята благодарност на МОН за финансовата подкрепа по Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“, одобрена с РМС №658 от 14.09.2018 г., договор ДО1-217/30.11.2018 и споразумения ДО1-323/18.12.2019 и ДО1-358/17.12.2020 и на ФНИ проект ДН11/16 18.12.2017

ПРИЛОЖЕНИЕ НА МЕТОДА НА CHOU-TALALAY КАТО ПОДХОД ЗА КОЛИЧЕСТВЕНА ОЦЕНКА НА СИНЕРГИЗМА ПРИ КОМБИНИРАНО ПРИЛАГАНЕ НА ПРИРОДНИ И СИНТЕТИЧНИ АНТИНЕОПЛАСТИЧНИ СРЕДСТВА

Росица Михайлова, Георги Момеков

Фармацевтичен факултет, Медицински университет – София

Едновременното приложение на две или повече лекарствени средства е честа практика при тежки и обикновено нелечими заболявания, каквито са неоплазиите, туберкулозата, тежките бактериални инфекции, HIV и др. Потенциалните ползи от една комбинирана терапия са свързани с постигане на синергистично терапевтично действие, което да позволи минимизиране на дозата на индивидуалните компоненти, тежестта на страничните реакции и дозолIMITИРАЩАТА токсичност, както и да забави или предотврати развитието на резистентност.

Изследването на лекарствените взаимодействия и доказването на синергистичен ефект поставят на преден план необходимостта от дефиниране на понятието лекарствен синергизъм. Основен принос в тази насока имат Ting-Chao Chou и Paul Talalay, чиито съвместни усилия доведоха до разработване на програма за количествена оценка на степента на синергистично и/или антагонистично действие между две и повече лекарства, прилагани във фиксирани или вариращи дози. На базата на този метод е разработен специализиран компютърен софтуер CompuSyn® за автоматизиран анализ на данните от „доза-ефект“ зависимостите и определяне степента на синергизъм и/или антагонизъм при реални и симулирани дозови стойности на изследваните вещества. Същият беше използван за проучване на комбинативните ефекти на съединения от природен и синтетичен произход при вариращи и фиксирани дозови отношения върху панел от човешки туморни клетъчни линии с различен произход и химичночувствителност.

Благодарности: Авторите изказват своята благодарност на МОН за финансовата подкрепа по Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“, одобрена с РМС №658 от 14.09.2018 г., договор ДО1-217/30.11.2018 и споразумения ДО1-323/18.12.2019 и ДО1-358/17.12.2020 и на ФНИ проект ДН11/16 18.12.2017

БЛОКСЪПОЛИМЕРНИ НОСИТЕЛИ ЗА НАНОМЕДИЦИНА: ОТ МИЦЕЛИ СЪС СТРУКТУРА “ЯДРО-ОБВИВКА” ДО МУЛТИФУНКЦИОНАЛНИ НАНОЧАСТИЦИ

Петър Д. Петров

*Институт по полимери - Българска академия на науките, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 103-А,
1113 София*

e-mail: ppetrov@polymer.bas.bg

Лекцията обхваща основните закономерности при формиране на полимерни мицели от вида „ядро-обвивка“ от амфифилни блокови съполимери чрез самоасоцииране в селективен разтворител. Представени са иновативни подходи за получаване на мултифункционални мицелни наноагрегати чрез подходящ дизайн на структурата и състава на изграждащите ги съполимери. Илюстрирани са възможностите за приложение на полимерни мицели в наномедицината като системи за контролирано доставяне на биологично активни вещества.

Благодарности: Авторите изказват своята благодарност на МОН за финансовата подкрепа по Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“, одобрена с РМС №658 от 14.09.2018 г., договор ДО1-217/30.11.2018 и споразумения ДО1-323/18.12.2019 и ДО1-358/17.12.2020 и на ФНИ проект ДН11/16 18.12.2017

ТЕМПЕРАТУРНО-ЧУВСТВИТЕЛНИ СЪПОЛИМЕРНИ МРЕЖИ НА
ОСНОВАТА НА ПОЛИ(N-ИЗОПРОПИЛАКРИЛАМИД): ДИЗАЙН И РЕГУЛИРАНЕ
НА СВОЙСТВАТА ЗА БИОМЕДИЦИНСКИ ПРИЛОЖЕНИЯ

Даринка Христова, Сийка Иванова

*Институт по полимери - Българска академия на науките, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 103-А,
1113 София*

e-mail: dchristo@polymer.bas.bg

В лекцията ще бъдат разгледани различни синтетични подходи за получаване на „интелигентни“ съполимерни мрежи на основата на поли(N-изопропилакриламид), способни да реагират обратимо на промени в температурата на околната среда. Ще бъде показано как чрез дизайн на съполимерната архитектура свойствата на мрежите и производните хидрогелове могат да бъдат контролирани и насочено променяни с оглед на потенциалното им приложение като нови платформи за устойчиво доставяне на биоактивни молекули. Ще бъде демонстрирани възможностите за използване на „интелигентните“ свойства на изследваните хидрогелове в процеса на натоварване с биоактивно вещество, както и за модулиране на неговото освобождаване.

Благодарности: Авторите изказват своята благодарност на МОН за финансовата подкрепа по Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“, одобрена с РМС №658 от 14.09.2018 г., договор ДО1-217/30.11.2018 и споразумения ДО1-323/18.12.2019 и ДО1-358/17.12.2020 и на ФНИ проект ДН11/16 18.12.2017

БИОАКТИВНИ СЪЕДИНЕНИЯ С ПОТЕНЦИАЛНО ПРИЛОЖЕНИЕ В МЕДИЦИНАТА

Александър Долашки, Людмила Велкова, Венцеслав Аатанасов, Димитър Кайнаров, Ася Даскалова, Момчил Кермедчиев и Павлина Долашка

Институт по органична химия с Център по фитохимия, БАН, ул. Акад.Г. Бончев, бл. 9, 1113 София

Слузта от охлюв *Helix aspersa* е сложна смес от биоактивни съединения с потенциално фармакологично приложение. Тя се събира и пречиства от градински охлюви *H. aspersa*, отглеждани в български ферми по патентована технология. Изолираният екстракт от слуз допълнително се разделя на няколко фракции чрез ултрафилтрация върху различни мембранни филтри Millipore.

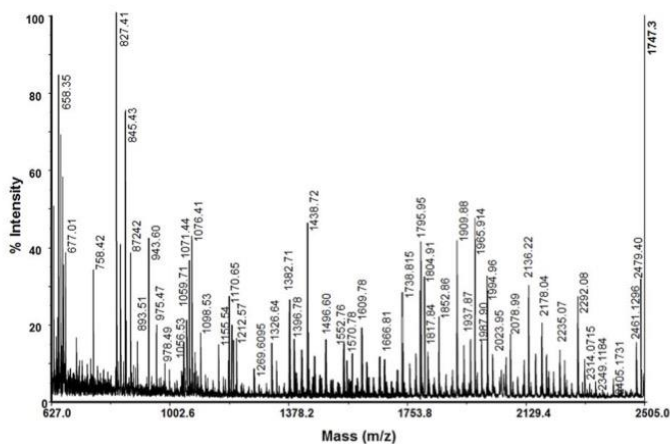
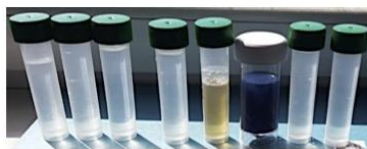
Проведените анализи със съвременна апаратура като високо-ефективна течна хроматография ((FPLS система), маспектрометрия (MALDI-MS/MS анализ), 1- и 2-дименсионална полиакриламидна гел електрофореза (2Д-ПАГЕ) и др. показват, че фракции с молекулна маса (MW) <10kDa, <20kDa между 10-30kDa, над 30kDa и над 50kDa съдържат различни биоактивни съединения.

Използвайки *de novo* секвениране (MALDI-MS/MS анализ) са идентифицирани основните структури на над 40 нови антимикробни пептиди с молекулна маса между 1-5 kDa. Повечето от тях съдържат високо ниво на глицинови, пролинови, триптофилови и валинови остатъци, характерни за пептидите с антимикробна активност

Проведените тестове с получените фракции показват различна биологична активност - антимикробна и антиоксидантна активност, имуномодулиращо и регенериращо действие. Въз основа на нашата изследователска дейност създадохме различни естествени продукти: хранителни добавки, козметични продукти като регенериращи гелове, кремове и серуми и медицински продукт гел за рани, които се реализират на българския и международен пазар.

Благодарности: Тази работа е подкрепена от изследователски проект DN 01/14 от 19.12.2016 г., финансиран от Фонда за научни изследвания на Министерството на образованието и науката в Република България. Авторите изказват своята благодарност на МОН за финансовата подкрепа по Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“, одобрена с РМС №658 от 14.09.2018 г., договор ДО1-217/30.11.2018 и споразумения ДО1-323/18.12.2019 и ДО1-358/17.12.2020.

MALDI-TOF-MS анализ на пептидната фракция с MW<3 kDa, от слузта на *C. aspersum*.



MALDI-TOF-MS анализ на пептидната фракция с MW<3 kDa, от слузта на *C. aspersum*.



Антимикробни пептиди, изолирани от слузта на охлюв <i>C. aspersum</i>		MALDI [M+H] ⁺ (Da)
P1	VGCLHEGL	827.41
P2	KKDVGLGLGG	943.60
P3	MLGGGWNP PK	1056.53
P4 ^a	MPDGALLGGGGD	1059.71
P5	NP G VCD E SP P G	1071.44
P6	MGVGGGGAGGAG PP GG	1155.54
P7	DLTLNGLSP K	1057.58
P8	KVKDNQWR P	1170.65
P9	WHSEGNVGLNA	1183.55
P10	RV L GNWLGLGL	1197.72
P11 ^a	NLVGGLSGGGRGGA P GG	1382.71
P12	EPNGGGEGGGLLGVAL	1396.78
P13 ^a	NLVGGSGGGGRGGAN PL G	1496.60
P14 ^a	NG P NGGLGGS L VNGD PK	1552.76
P15	PRGSGGRGGSHGGGLPP	1559.76

МОЛЕКУЛЯРЕН АНАЛИЗ НА МИКРОБИОМА

Галина Радева

*Институт по молекулярна биология, Българска академия на науките, ул. Акад.Г.Бончев,
бл. 21, София 1113*

Лекцията ще представи типичните стъпки, включени в проекти за микробиоми, започвайки от събиране и съхранение на проби, 16S рРНК и амплификация на други маркерни гени, ампликон, и метагеномно секвениране до биоинформатичния анализ на секвенираните последователности.

Благодарности: Авторите изказват своята благодарност на МОН за финансовата подкрепа по Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“, одобрена с РМС №658 от 14.09.2018 г., договор ДО1-217/30.11.2018 и споразумения ДО1-323/18.12.2019 и ДО1-358/17.12.2020 и на ФНИ проект ДН11/16 18.12.2017

МОДЕЛИРАНЕ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НА БИОМОЛЕКУЛИ

Леандър Литов

Физически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, София

Представени са физическите основи на методите за симулиране на взаимодействия на сложни молекули. Особено внимание е отделено на молекулярно динамични симулации. Изложените методи са демонстрирани на примера на взаимодействие на антимикробни пептиди с бактериална мембрана.

Благодарности: Авторите изказват своята благодарност на МОН за финансовата подкрепа по Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“, одобрена с РМС №658 от 14.09.2018 г., договор ДО1-217/30.11.2018 и споразумения ДО1-323/18.12.2019 и ДО1-358/17.12.2020 и на ФНИ проект ДН11/16 18.12.2017

СЪВРЕМЕННИ МЕТОДИ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА БЕЛТЪЧНИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Геновева Начева, Елена Кръчмарова

*Институт по молекулярна биология, Българска академия на науките, ул .Акад.Г.Бончев,
бл. 21, София 1113*

Дали дадени белтъци си взаимодействат? Как става това? Способността на нов(ооткрит) белтък да взаимодейства с познати, детайлно охарактеризирани белтъци може да даде важна информация за неговите функции. Стабилността на белтъците и техните термодинамични параметри на взаимодействие са от ключово значение за правилния дизайн на експериментите, целящи детайлното му изследване. В настоящата лекция ще ви запознаем с няколко метода, намиращи широко приложение при изучаване на стабилността и спецификата на белтък-белтъчните взаимодействия.

Благодарности: Авторите изказват своята благодарност на МОН за финансовата подкрепа по Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“, одобрена с РМС №658 от 14.09.2018 г., договор ДО1-217/30.11.2018 и споразумения ДО1-323/18.12.2019 и ДО1-358/17.12.2020 и на ФНИ проект ДН11/16 18.12.2017

КЛАСИКАТА Е МОДЕРНА: PCR U WESTERN BLOT – ПОДХОДИТЕ, БЕЗ КОИТО НЕ МОЖЕМ

Мария Петрова, Йордана Тодорова

*Институт по молекулярна биология, Българска академия на науките, ул. Акад.Г.Бончев,
бл. 21, София 1113*

Анализът на генната експресия е от решаващо значение за разбирането на молекулярните основи на нормалните и болестотворни процеси, протичащи в клетката. В настоящата лекция ще се спрем на двата основни класически метода, описващи начина и нивото на превеждане на генетичната информация от ДНК, през иРНК до белтък, а именно – полимеразна верижна реакция (PCR) и имунодетекция на целеви белтък, чрез свързването му със специфично антитяло – Western blot-анализ. PCR-подходът дава революционен тласък в молекулярната биология, тъй като позволява получаването на стотици хиляди копия *in vitro* от таргетен участък на ДНК, както и проследяване нивото на матрична РНК в реално време чрез *real time* PCR. Western blot-анализът пък ни позволява да откриваме специфични молекули измежду смес от стотици различни белтъци. Комплексното съчетание от двата метода ни дава една по-пълна картина за сложните процеси, свързани с осъществяването на генетичната информация чрез превеждане от ДНК до белтък.

Благодарности: Авторите изказват своята благодарност на МОН за финансовата подкрепа по Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“, одобрена с РМС №658 от 14.09.2018 г., договор ДО1-217/30.11.2018 и споразумения ДО1-323/18.12.2019 и ДО1-358/17.12.2020 и на ФНИ проект ДН11/16 18.12.2017

