



Трето национално лятно
училище по природни
продукти с приложение в
медицината

хотел „Аква“, Бургас
27 юни- 2 юли 2023

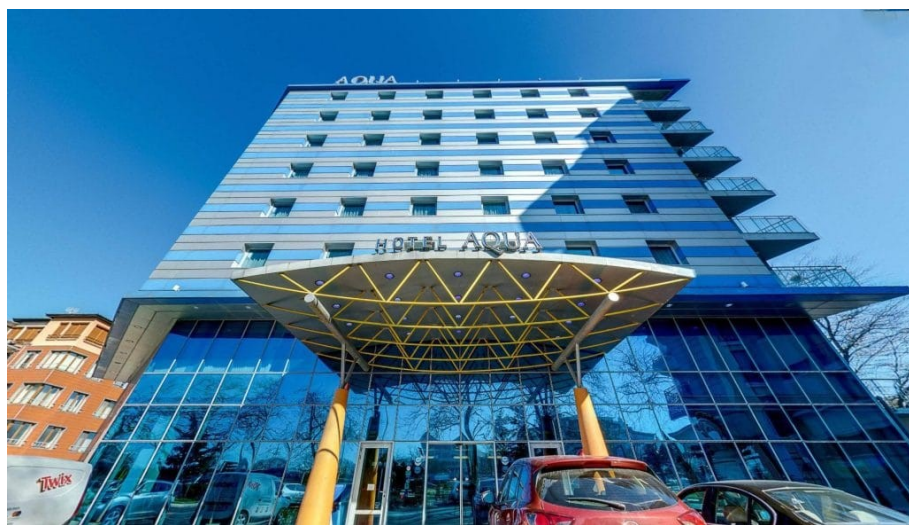




Място на провеждане:

Хотел „Аква“ Бургас

бул. Демокрация, комплекс Лазур №129, 8000 Бургас



Организационен комитет:

Председател: проф. Ива Угринова

Членове: д-р Шазие Мяшкова

ас. Златина Влахова

ас. Соня Станева

д-р Мария Петрова



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		
27.06.2022 Вторник		
16.00-18.00	РЕГИСТРАЦИЯ	
28.06.2022 Сряда		
10.00-10.15	проф. Ива Угринова	ТЪРЖЕСТВЕНО ОТКРИВАНЕ НА МЕРОПРИЯТИЕТО. ПРИВЕТСТВЕНО СЛОВО.
МЛАДЕЖКА КОНФЕРЕНЦИЯ		
10.15-10.30	Петър Кънев Стр.50	ЕФЕКТ НА НЕОГРАНИЧЕНОТО ПАРИЛИРАНЕ ВЪРХУ ДИНАМИКАТА НА PARP1 В КОМПЛЕКСНИ ДНК УВРЕЖДЕНИЯ
10.30-10.45	Катя Каменова Стр.40	ПОЛУЧАВАНЕ НА ИНЖЕКЦИОНЕН НАНОКОМПОЗИТЕН IN SITU ХИДРОГЕЛ ЗА ДОСТАВЯНЕ НА КАНАБИДИОЛ
10.45-11.00	Инна Суликовска Стр. 55	ПРОТИВОТУМОРНО И ИМУНОМОДУЛИРАЩО ДЕЙСТВИЕ НА ХЕМОЦИАНИНИ ОТ <i>HELIX LUCORUM</i> , <i>HELIX ASPERSA</i> И <i>RAPANA VENOSA</i> ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА АСЦИТЕН КАРЦИНОМ НА ЕРЛИХ
11.00-11.30	Кафе пауза	
11.30-11.45	Лазар Лазаров Стр. 53	ЕФЕКТ НА КАНАБИДИОЛ (CBD) ВЪРХУ ПРОЛИФЕРАЦИЯТА, КЛЕТЪЧНИЯТ ЦИКЪЛ И МЕТАСТАТИЧНИЯТ ПОТЕНЦИАЛ НА IN VITRO МОДЕЛ НА РАК НА БЯЛ ДРОБ
11.45-12.00	Десислава Владимирова Стр. 46	ПРЕДИМСТВО НА 3D РАКОВИ КЛЕТЪЧНИ МОДЕЛИ ПРИ ИЗСЛЕДВАНЕТО НА ЕМТ ПРЕХОД СЛЕД ТРЕТИРАНЕ С HMGB1
12.00-12.15	Инна Суликовска Стр. 38	ОЦЕНКА НА АНТИТУМОРНАТА АКТИВНОСТ НА ВОДНИ ЕКСТРАКТИ ОТ <i>CHROOCOCCUS SP.</i>
12.15-12.30	Ина Атанасова Стр. 52	ВЛАКНЕСТИ МАТЕРИАЛИ ОТ ШИФОВА БАЗА НА ХИТОЗАНА И ПОЛИЛАКТИД С АНТИБАКТЕРИАЛНА И ПРОТИВОРАКОВА АКТИВНОСТ
12.30-14.00	Обяд	
14.00-14.30	Румен Стаматов Стр. 57	СЕГМЕНТАЦИЯ И ПРОСЛЕДЯВАНЕ НА ХРОМОЗОМИ ЧРЕЗ МАШИННО ОБУЧЕНИЕ
14.30-14.45	Златина Влахова Стр. 48	АНТИТУМОРНА АКТИВНОСТ НА НОВОСИНТЕЗИРАНИ ДНК ИНТЕРКАЛИРАЩИ ХЕТЕРОЦИКЛЕНИ КОНДЕНЗИРАНИ НАФТАЛИМИДИ
14.45-15.00	Соня Станева Стр. 36	НАТ1 КАТО КАНДИДАТ ЗА НОВА АЦИЛ-ТРАНСФЕРАЗА
15.00-15.15	Александър Цинцаров Стр. 42	ИЗОЛИРАНЕ, РАЗДЕЛЯНЕ И ПРЕЧИСТВАНЕ НА ФИТОХИМИКАЛИ ОТ ПЛОДОВЕ НА <i>S.NIGRA</i> ЗА АНАЛИЗ НА БИОЛОГИЧНАТА ИМ АКТИВНОСТ



15.15-15.30	Радина Николова Стр. 34	ДВА МОЛЕКУЛЯРНИ ПОДХОДА ЗА ИЗУЧАВАНЕ СТРУКТУРАТА НА БАКТЕРИАЛНИТЕ СЪОБЩЕСТВА
15.30-15.45	Венцеслав Атанасов Стр. 44	ПРОТЕИНОВ ПРОФИЛ НА КОРТЕКС ОТ ПЛЪХ ПРИ СКОПОЛАМИН – ИНДУЦИРАНА ДЕМЕНЦИЯ ОТ АЛЦХАЙМЕР ТИП С ПРИЛАГАНЕ НА СЛУЗ ОТ ОХЛЮВИ КАТО НЕВРОПРОТЕКТИВЕН АГЕНТ
29.06.2022 Четвъртък		
МЛАДЕЖКО ЛЯТНО УЧИЛИЩЕ		
10.00-10.30	проф. Оля Стоилова Стр. 27	ХИБРИДНИ ВЛАКНЕСТИ ПОЛИМЕРНИ МАТЕРИАЛИ С НАСОЧЕН ДИЗАЙН И ПРИЦЕЛНИ СВОЙСТВА
10.30-11.00	доц. Иван Илиев Стр. 16	ТЕСТ ЗА ФОТОБЕЗОПАСНОСТ IN VITRO BALB/C 3T3 NRU ASSAY ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПРИРОДНИ ВЕЩЕСТВА
11.00-11.30	Кафе пауза	
11.30-12.00	проф. Невена Илиева Стр. 23	ЕЛЕКТРИЧНИЯТ ЗАРЯД В КОНТЕКСТА НА БИОЛОГИЧНАТА ФУНКЦИЯ: РАЗКАЗ ЗА ПЕПТИДИ
12.00-12.30	Доц. Пейчо Петков д-р Елена Кръчмарова Стр. 28	КАК ДА ИЗСЛЕДВАМЕ АНТИМИКРОБНИ ПЕПТИДИ
12.30-13.00	д-р Шазие Мяшкова Стр. 32	ПОСЛЕДНИ НОВОСТИ В БИОПРОИЗВОДСТВОТО НА РЕКОМБИНАНТНИ БЕЛТЪЦИ
13.00-14.00	Обяд	
14.00-14.30	проф. Павлина Долашка Стр. 11	СТРУКТУРА И КОНФОРМАЦИОННА СТАБИЛНОСТ НА НОВ ЕНЗИМ СИАЛИДАЗА, ИЗОЛИРАН ОТ ГЪБИЧНИ ЩАМ <i>PENICILLIUM GRISEOFULVUM</i> P29
14.30-15.00	доц. Александър Долашки Стр. 12	СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА СВОЙСТВАТА НА НОВА СИАЛИДАЗА ОТ ГЪБИЧНИ ЩАМОВЕ
15.00-15.30	проф. Леандър Литов Стр. 21	ЧОВЕШКИЯТ ИНТЕРФЕРОН ГАМА КАТО ПОТЕНЦИАЛЕН ИНХИБИТОР НА АКТИВНОСТТА НА SARS-COV-2: IN SILICO ПЕРСПЕКТИВА
15.30-16.00	проф. Деница Момекова проф. Ива Угринова Стр. 9	ДИЗАЙН И ОХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА pH- ЧУВСТВИТЕЛНИ НИОЗОМИ КАТО НОСИТЕЛИ ЗА СИСТЕМНО ПРИЛОЖЕНИЕ НА ПРИРОДНИ ВЕЩЕСТВА
30.06.2022 Петък		
10.00-10.30	Златина Влахова проф. Ива Угринова Стр. 7	АДИТИВНИ ЕФЕКТИ НА МУКУСНИ ФРАКЦИИ ОТ <i>HELIX ASPERSA</i> С ХИМИОТЕРАПЕВТИЧНИ ЛЕКАРСТВА ПРИ РАК НА ГЪРДАТА: ИЗСЛЕДВАНЕ НА АНТИПРОЛИФЕРАТИВНИЯ ПОТЕНЦИАЛ
10.30-11.00	доц. Галина Радева Стр. 15	МОЛЕКУЛЯРНИ ПОДХОДИ ЗА ИЗУЧАВАНЕ НА МИКРОБИОМА
11.00-11.30	д-р Елена Лилкова Стр. 13	МОЛЕКУЛНО МОДЕЛИРАНЕ НА ПРИСАДЕНИ ЦИКЛОТИДИ
11.30-12.00	Кафе пауза	
12.00-12.30	проф. Николай Василев Стр. 25	ЯМР СПЕКТРОСКОПИЯТА В ОТКРИВАНЕТО И РАЗРАБОТВАНЕТО НА ЛЕКАРСТВА ОТ ПРИРОДНИ ПРОДУКТИ



12.30-13.00	доц. Йордана Тодорова Стр. 19	РОЛЯТА НА HMGB1 В ЕПИТЕЛНО-МЕЗЕНХИМНИЯ КЛЕТЪЧЕН ПРЕХОД И ФОРМИРАНЕТО НА МЕТАСТАЗИ ПРИ ТУМОРНА ПРОГРЕСИЯ
13.00-13.30	проф. Спиро Константинов Стр. 30	ИНДУКЦИЯ НА КЛЕТЪЧНА СМЪРТ ПРИ ОЦЕНКА НА АНТИНЕОПЛАСТИЧНИЯ ЕФЕКТ НА НИСКОТОКСИЧНИ БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ВЕЩЕСТВА
01.07.2022 Събота		
10.00-13.30	Тематични научни работилници на открито	
13.30-14.00	чл. кор. Евдокия Пашева	ЗАКЛЮЧИТЕЛНА ЛЕКЦИЯ И НАГРАЖДАВАНЕ



МЛАДЕЖКО ЛЯТНО УЧИЛИЩЕ

ЛЕКЦИИ



АДИТИВНИ ЕФЕКТИ НА МУКУСНИ ФРАКЦИИ ОТ *HELIX ASPERSA* С ХИМИОТЕРАПЕВТИЧНИ ЛЕКАРСТВА ПРИ РАК НА ГЪРДАТА: ИЗСЛЕДВАНЕ НА АНТИПРОЛИФЕРАТИВНИЯ ПОТЕНЦИАЛ

Ива Угринова^{1*}, Златина Влахова¹, Александър Цинцаров¹, Мария Петрова¹, Александър Душков¹, Александър Долашки², Людмила Велкова² и Павлина Долашка²

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

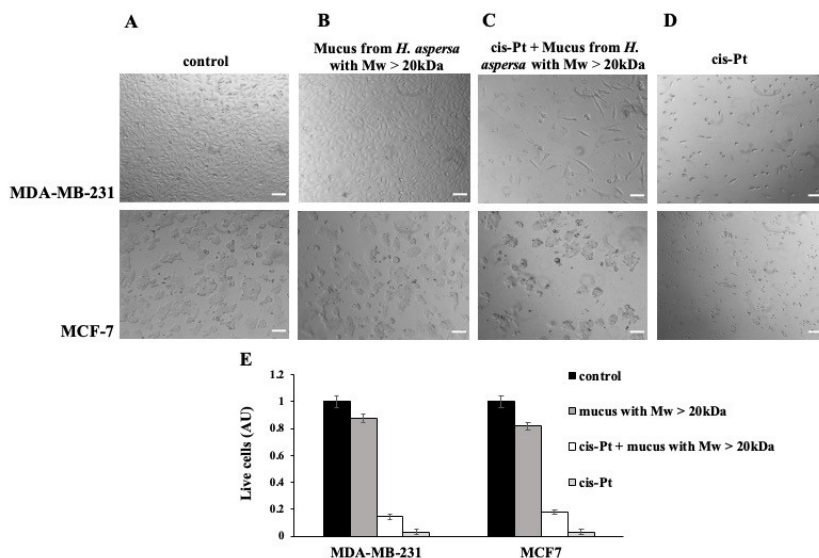
²Институт по Органична химия с Център по фитохимия, БАН, София 1113, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 9

Ключови думи: рак, природни вещества, *Helix aspersa*, синергизъм

Ракът остава глобален проблем за здравето, което налага търсенето на нови ефективни и безопасни противоракови агенти. Естествените продукти, получени от растения и животни, включително мекотели като охлюви, привлякоха внимание като потенциални източници на нови противоракови съединения. Това изследване се фокусира върху *in vitro* оценка на антитуморната ефикасност на биоактивни вещества (BAS), получени от хемолимфата на градинския охлюв *Helix aspersa* върху различни човешки ракови клетъчни линии, представляващи различни видове рак. Резултатите показват, че някои хемоцианинови субединици от *H. aspersa* проявяват цитотоксична активност, сравнима с цисплатина, широко използвано лекарство за химиотерапия. Поставихме фокус на проучването върху антипролиферативните ефекти на BAS, получени от слюзта на градински охлюв *Helix aspersa* върху клетъчни линии на рак на гърдата (MCF-7 и MDA-MB-231) и неракова клетъчна линия (MCF -10A). Бяха изследвани две служни фракции с различно молекулно тегло (Mw) и бяха оценени техните взаимодействия с химиотерапевтичните лекарства Cisplatin и Tamoxifen.

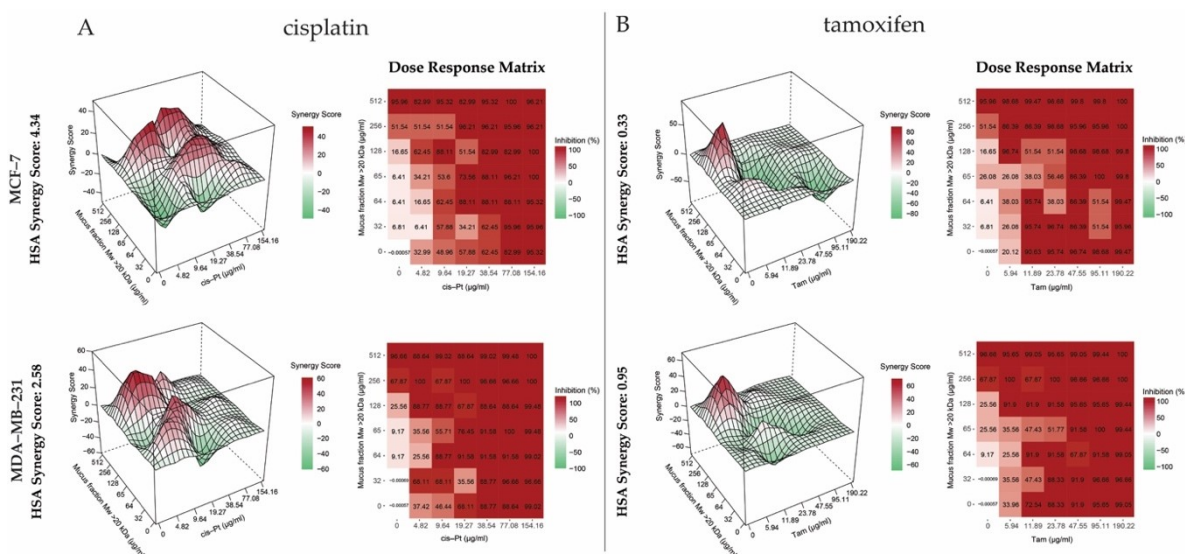
Резултатите показват, че фракциите на слюзта проявяват лек антипролиферативен ефект върху клетките на рака на гърдата, като фракцията с Mw над 50 kDa демонстрира по-силна активност в сравнение с фракцията с Mw над 20 kDa. Освен това, комбинацията от фракциите на слюзта с цисплатина или тамоксифен води до значително намаляване на половината ефективна доза, което показва възможни синергични ефекти, по-изразени с фракцията с Mw над 20 kDa. Кривите доза-отговор и микроскопските изображения подкрепят наличието на такива ефекти, разкривайки по-ниски стойности на IC₅₀ и значителна клетъчна смърт, когато раковите клетки са били третирани с комбинация от служни фракции и химиотерапевтични лекарства.

Тези открития разкриват потенциала на биологично активните вещества, получени от слюзта на *Helix aspersa*, за подобряване на антипролиферативните ефекти на химиотерапевтичните лекарства при лечение на рак на гърдата. Идентифицирането на адитивните взаимодействия дава представа за разработването на комбинирани терапии с намалена дозировка на лекарството. Като цяло, това проучване допринася за разбирането на антипролиферативните ефекти на служните фракции на *Helix aspersa* и техните взаимодействия с химиотерапевтични лекарства, подчертавайки техния потенциал като нови терапевтични подходи при лечението на рак на гърдата.



като произволни единици (AU)

Фигура 1. Микроскопски изображения на клетъчни линии на рак на гърдата MDA-MB-231 и MCF-7. А/ контролни клетки; В/ клетки, третирани с IC50 на мукусна фракция с Mw над 20 kDa; С/ клетки, третирани с IC50 на мукусна фракция с Mw над 50 kDa D/ клетки, третирани с IC50 на цисплатин; Е/ Количествено определяне на живи клетки, определено след оцветяване с Трупан Blue, изчислено



Фигура 1. Комбинирани графики и матрици доза-отговор в клетъчни линии MCF-7 и MDA-MB-231, третирани със слuzна фракция на *H. aspersa* с Mw над 20 kDa и цисплатин (A) или тамоксифен (B).

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, ДО1-358/17.12.2020 и ДО1-278/03.12.2021.

ДИЗАЙН И ОХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА pH-ЧУВСТВИТЕЛНИ НИОЗОМИ КАТО НОСИТЕЛИ ЗА СИСТЕМНО ПРИЛОЖЕНИЕ НА ПРИРОДНИ ВЕЩЕСТВА

Вилиана Гуглева¹, Росица Михайлова², Георги Момеков², Катя Каменова³, Петър Петров³, Мариана Петрова⁴, Ива Угринова^{4*} и Деница Момекова⁵

¹*Катедра "Фармацевтични технологии", Фармацевтичен Факултет, Медицински Университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“-Варна, ул. Цар Освободител 84, 9000 Варна, България;*

²*Катедра „Фармакология, фармакотерапия и токсикология“, Фармацевтичен Факултет, Медицински Университет - София, ул. Дунав 2, София 1000, България*

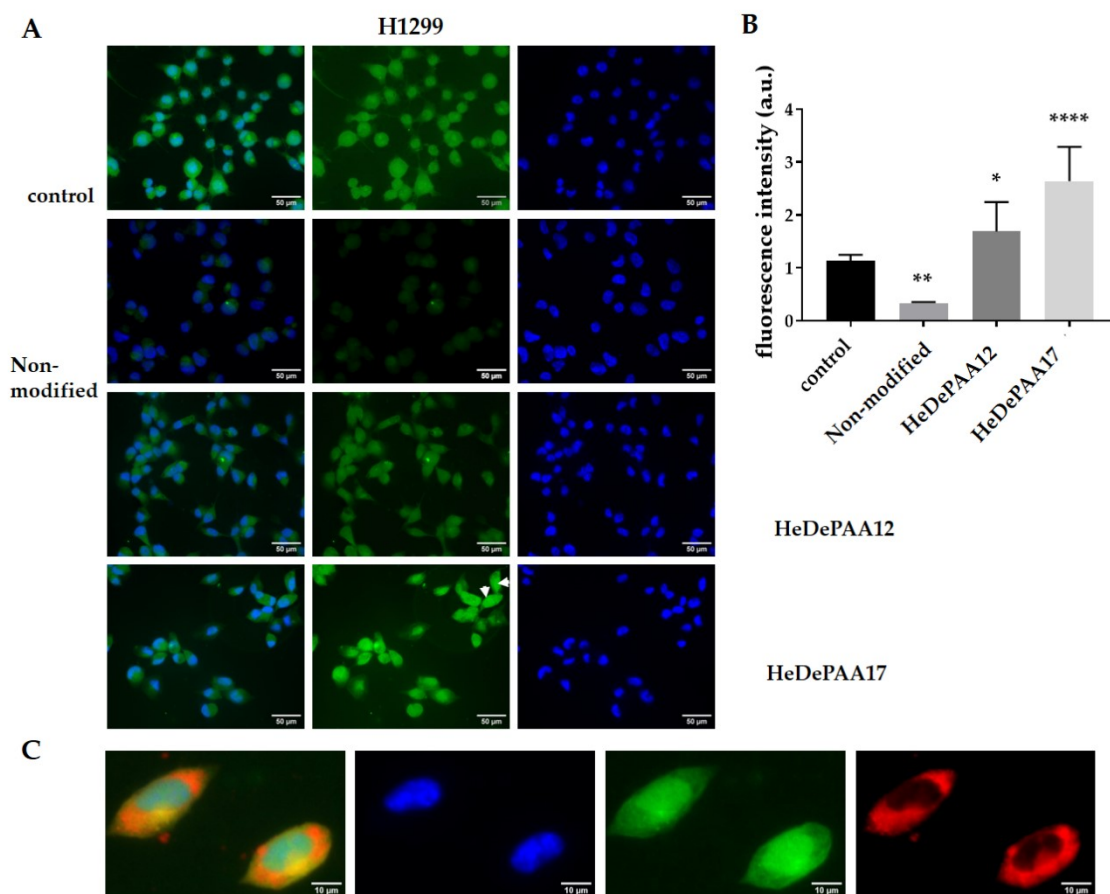
³*Институт по полимери, Българска Академия на Науките, бл. 103, ул. акад. Г. Бончев, 1113, София, България*

⁴*Институт по Молекулярна Биология, Българска Академия на Науките, бл. 21, ул. , ул. акад. Г. Бончев, 1113, София, България*

⁵*Катедра „Технология на лекарствените средства и биофармация“, Фармацевтичен Факултет, Медицински Университет - София, ул. Дунав 2, София 1000, България*

Ключови думи: pH-чувствителни ниозоми, апоптоза, куркумин, насочено лекарствено доставяне

pH-чувствителните ниозоми са везикуларни носители, съдържащи в структурата си сегменти, които претърпяват конформационни изменения при промени в pH на средата и освобождават включеното лекарствено вещество в прицелното място. Пониските стойности на pH в туморния интерстиций в сравнение с нормалните тъкани могат да бъдат успешно използвани като предпоставка за лекарствено насочване. Куркуминът е полифенолно съединение с изразена антипролиферативна активност. Целта на изследването е разработване, охарактеризиране и оценка на цитотоксичността на ниозоми натоварени с куркумин, модифицирани с pH-чувствителни хексадецил съполимери на основата на поли(акрилова киселина) (HeDePAA₁₂ и HeDePAA₁₇). Ниозомите на основата на Span 60/Tween 60 и холестерол (3.5:3.5:3 mol:mol), модифицирани с HeDePAA₁₇ (2.5%) се характеризират с малки размери (324 nm), много добра колоидна стабилност (ζ потенциал -22.1 mV), висока ефективност на натоварване (83%), pH-зависимо освобождаване на куркумин и изявена клетъчна интернализация. Включеният в ниозомите куркумин проявява по-изразена цитотоксична и проапоптотична активност в сравнение със свободното лекарство. На основата на получените резултати може да се заключи, че разработените pH-чувствителни ниозоми са перспективна платформа за насочено доставяне и освобождаване на куркумин в патологично променени тъкани.



Фигура 1. Представителни микрографии на клетъчната интернализаци в H1299 клетки, третиран за 6 часа с чист куркумин (първи ред) и натоварен в немодифицирани (втори ред), и pH-чувствителни ниозоми, модифицирани с HD-PAA₁₂ (трети ред), и HD-PAA₁₇ ниозоми (четвърти ред). Естествената флуоресценция на куркумина е зелена, а ядреното контрастно оцветяване с DAPI е синьо. Стрелките показват клетки с ядрена локализация на натоварени с куркумин HD-PAA₁₇ ниозоми..

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, ДО1-358/17.12.2020 и ДО1-278/03.12.2021. Както и на финансовата подкрепа по договор КП-06 Н43/3 2020.



СТРУКТУРА И КОНФОРМАЦИОННА СТАБИЛНОСТ НА НОВ ЕНЗИМ СИАЛИДАЗА, ИЗОЛИРАН ОТ ГЪБИЧНИ ЩАМ *PENICILLIUM* *GRISEOFULVUM* P29

Павлина Долашка^{1*}, Димитър Кайнаров¹, Людмила Велкова¹, Александър Долашки¹,
Радослав Абрашев², Екатерина Крумова², Мария Ангелова²

¹ Институт по органична химия с център по фитохимия - Българска академия на науките, ул.
„Акад . Г. Бончев , бл.9, 1113 София, България

² Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, Българска академия на науките , ул. „Акад
. Г. Бончев , бл.9, 1113 София, България

Сиалидазите (неураминидази, хидролази на N-ацетилнеурамина киселина, ЕС 3.2.1.18) принадлежат към семейство гликохидролитични ензими, които отстраняват сиаловата киселина от различни сиалопродукти. Те са широко разпространени в биологичните системи, но няма информация за изолиран ензим от нишковидни гъби. Това изследване представя информация за разпределението на сиалидазата във филаментозни гъби от неклинични изолати, наличието на гена на сиалидазата и свойствата на ензима. Сиалидазата е изолирана от гъбичен щам *P. griseofulvum* P29, култивиран в 3L биореактор при 20°C върху среда, допълнена с 0,5% суроватка.

Молекулната маса на ензим от гъбични щам *P. griseofulvum* P29 е определена електрофоретично (40 кДа), но точна молекулна маса от 39904,75 Да е измерена от MALDI-Tof /MS анализ, който съответства с изчислената маса 39903,75 Да от аминокиселинната последователност на ензима.

Друго доказателство, че изолираният ензим е сиалидаза е високата хомоложност на аминокиселинната последователност на пречистения ензим със сиалидази, изолирани от други източници. 3Д-моделът на структурата на сиалидазата *P. griseofulvum* P29 показва различно разположение на аминокиселините остатъци.

Наличие на 5 тирозилови и 9 триптофилови остатъци позволява да се проследи стабилността на ензим при различно рН на разтвора. Анализите чрез флуоресцентно спектроскопски метод показва рН зависимост на стабилност на ензима.

Благодарност: Тази работа е подкрепена от проект КР-06-N21/13, финансиран от Националния фонд "Научни изследвания" на Министерството на образованието и науката, България.



СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА СВОЙСТВАТА НА НОВА СИАЛИДАЗА ОТ ГЪБИЧНИ ЩАМОВЕ

Александър Долашки^{1*}, Павлина Долашка¹, Димитър Кайнаров¹, Людмила Велкова¹,
Радослав Абрашев², Екатерина Крумова², Мария Ангелова²

¹ *Институт по органична химия с център по фитохимия – Българска академия на науките, ул. „Акад. ул. Г. Бончев, бл.9, 1113 София, България*

² *Институт по микробиология Стефан Ангелов, Българска академия на науките, Академик Г. Бончев 26, 1113, София, България*

Сиалидазите (невраминидазите) включват семейство гликохидролитични ензими, широко разпространени в природата, включително вируси, протозои, бактерии, гъбички, гръбначни и висши животни. Функцията на ензима е да премахва остатъците от сиалова киселина от различни сиалопроизводни, като хидролизират крайните 2,3-, 2,6- или 2,8-свързани N- или O-ацилнеураминови киселини в гликопротеините, гликолипиди, полизахариди, мукополизахариди и олигозахариди. Въз основа на аминокиселинните последователности сиалидазите са включени в четири семейства въглехидратно-активни ензими. Подреждането на AAS на неураминидаза, изолирана от *P. patulum* P29, със сиалидазите на други гъбични щамове (KXG51741.1 Neuraminidase [*Penicillium griseofulvum*]; XP_002560442.1 Pc16g00170 [*Penicillium rubens* Wisconsin 54-1255]; CRL20054.1 Neuraminidase [*Penicillium camemberti*]; KGO67483.1 Неураминидаза [*Penicillium italicum*]; XP_748867.1 BNR/Asp-box повтарящ се домейн протеин [*Aspergillus fumigatus* Af293]; KAI9376722.1 Сиалидаза [*Aspergillus egyptiacus*]) показва висока хомоложност.

Въпреки сходството на тяхната последователност (<40% идентичност), всички сиалидази споделят подобен каталитичен домен, наблюдаван при вирусни, бактериални и еукариотни ензими.

Благодарност: Тази работа е подкрепена от проект КР-06-N21/13, финансиран от Националния фонд "Научни изследвания" на Министерството на образованието и науката на България.



МОЛЕКУЛНО МОДЕЛИРАНЕ НА ПРИСАДЕНИ ЦИКЛОТИДИ

Шубяо Пенг¹, Пейчо Петков², Елена Лилкова³, Невена Илиева³

¹ Център за изследване на квантови технологии, Пекински технологичен институт,
100081 Пекин, КНР

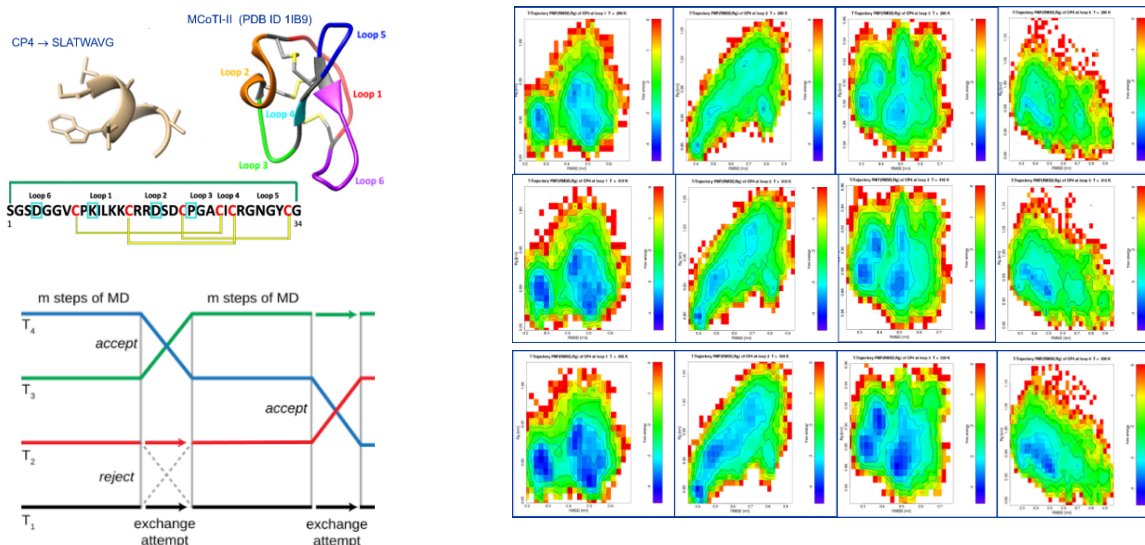
² Софийски университет „Св. Кл. Охридски“, Физически факултет,
бул. Джеймз Баучер 5, 1164 София

³ Българска академия на науките, Институт по информационни и комуникационни
технологии, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 25А, 1113 София

Ключови думи: циклотоди, присадени пептиди, конформационна стабилност, молекулна динамика с размяна на реплики

Циклотидите са специален клас нелинейни (циклични) пептиди с дължина 28-37 аминокиселинни остатъка и комплексна топология на възел тип детелина (trefoil knot): стабилизираща структура от три преплетени дисулфидни връзки, които формират т. нар. мотив на цикличния цистинов възел (ССК)¹. Те проявяват широк спектър от биологични активности, сред които антимикробна, инсектицидна, антитуморна и анти-ХИВ. Размерът им, конформационната стабилност, температурната устойчивост и устойчивостта им на протеолитично разграждане ги правят идеална стабилизираща скелетна конструкция (молекулна матрица) за присаждане на други биологично активни епитопи². В резултат на присаждането възникват специфични конформации и нови функции. Динамичните последици от процедурата на присаждане обаче все още не са изучени и разбрани.

Експериментални данни сочат, че молекулата на MCoCP4, получена чрез присаждане на линейна производна верига на инхибитора на Паркинсон CP4 върху бримка 6 на циклотида MCoTI-I, може евентуално да намали в значителна степен цитотоксичността на α -синуклеин, което я прави обещаваща терапията за болестта на Паркинсон³. За изучаване на динамичните последици от процедурата на присаждане, разширихме обхвата на изследванията като включихме и в значителна степен хомоложния циклотид MCoTI-II (разлика в два от общо 34 остатъка; Фиг. 1, горен ляв панел). Бяха проведени стандартни молекулно-динамични (МД) симулации с продължителност от 3 микросекунди за всяка от изследваните топологии, както и молекулно-динамични симулации с размяна на реплики (REMD) в температурния интервал от 290 K до 330 K.



Фигура 1. Схема на присаждане (горе вляво); R-траектории, оцветени с еднакъв цвят по произход и изотермални T-траектории в REMD (долу вляво); Двумерни Rg/RMSD графики на REMD T-траекториите за изследваните топологии на присаждане (колони) при температури съответно 290 K, 310 K и 330 K (редове; десен панел).

При проведените *in silico* експерименти се наблюдават съществени разлики в подвижността и конформационната пластичност на различните части на проектираните мимики в зависимост от позицията на присаждане, разпределението на заряда, спецификите на първоначалната конформация и температурата. Двумерните хистограми на REMD T-траекториите разкриват различен брой състояния в характеристични области на конформационните пространства, повишена локализация и дори тенденция към едно единствено състояние при висока T за две от присадките (Фиг. 1, долен ляв и десен панел)⁴. Целта на изследването е чрез оптимизиране на позицията на присаждане на активния компонент върху молекулната матрица (scaffold) да идентифицираме обективни критерии за интелигентен дизайн на присадени циклотиди с предварително определени терапевтични свойства.

Литература:

- ¹ D.J. Craik, N.L. Daly, T. Bond, C. Waite, J. Mol. Bio. 294(5) (1999) 1327-1336
- ² D. Chaudhuri, T. Aboye, J.A. Camarero, Biochem. J. 476(1) (2019) 67-83
- ³ J.A. Kritzer et al., Nature Chem. Biology 5(9) (2009) 655-663
- ⁴ Y. Cheng, X. Peng, P. Petkov, N. Ilieva, Studies Comp. Intell. (Springer, Cham, 2023; in press)

Благодарности: Авторите изказват своята благодарност на ФНИ за частична финансовата подкрепа по договор КП-06-Китай-10/2020, както и на Междуправителствения проект за научно-техническо сътрудничество между Китай и България към Министерството на науката и технологиите на Китайската народна република (2021.1). Достъп до изчислителни ресурси бе осигурен от високопроизводителния клъстер BioSim във Физически факултет на Софийски университет „Св. Кл. Охридски“ и от суперкомпютърния център CI TASK (Гданск, Полша).

МОЛЕКУЛЯРНИ ПОДХОДИ ЗА ИЗУЧАВАНЕ НА МИКРОБИОМА

Галина Радева

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

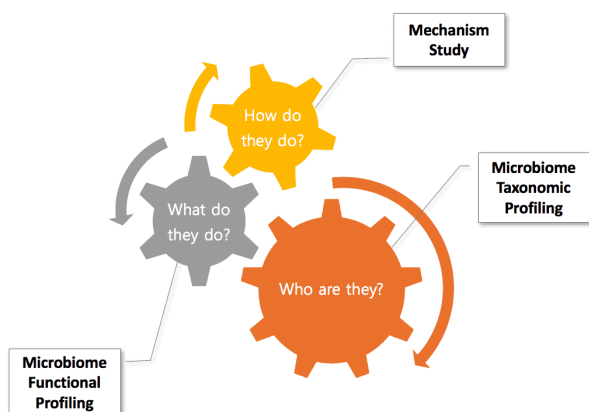
*[*galrad@abv.bg](mailto:galrad@abv.bg)*

Изследванията на микробните съобщества – микробиома добиха популярност през последните години. Напредъкът на тези проучвания се базира на технологиите за секвениране на ДНК и анализ на данни, които предоставят секвенирани профили на микробни съобщества от различни източници и сравняват данните за изясняване на асоциирания модел на микробиотата. В лекцията ще бъдат обсъдени най-добрите практики в лабораторната работа и експерименталния дизайн, избор на технология за молекулярен анализ, методи за анализ на данни, важни за изследване на микробиома.

Повечето примери ще бъдат за 16S rPHK таргетно секвениране и за ITS (internal transcribed spacer) региона като таргет за охарактеризиране на гъбните съобщества. Представени ще бъдат нашите изследвания върху екологичното разнообразие на почвения микробиом в замърсени с тежки метали почви.

Ключови думи: микробиом, 16S rPHK секвениране, метагеномно секвениране, гъби.

Фигура 1. Целите на изследването на микробиома са да се разбере (i) кои са обитателите (ii) какво правят и (iii) как го правят.



<https://help.ezbiocloud.net/microbiome-basics/>

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, ДО1-358/17.12.2020 и ДО1-278/03.12.2021.

ТЕСТ ЗА ФОТОБЕЗОПАСНОСТ *IN VITRO* BALB/C 3T3 NRU ASSAY ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПРИРОДНИ ВЕЩЕСТВА

Иван Илиев¹, Инна Суликовска¹, Ани Георгиева¹, Светлозара Петкова¹, Валерия Дилчева¹, Ивелин Владов¹, Людмила Велкова², Павлина Долашка²

¹Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей – Българска академия на науките, ул. Акад. Георги Бончев, бл. 25, 1113 София, България

²Институт по органична химия с център по фитохимия – Българска академия на науките, ул. Акад. Георги Бончев, бл. 9, 1113 София, България

Ключови думи: Цитотоксичност, Фототоксичност, LED-слънчев симулатор

Фототоксичността е често срещано явление предизвикано от някои вещества със синтетичен или природен произход, които абсорбират слънчева светлина [1]. Фототоксичният ефект се дължи на бензенови ядра и хетероциклени пръстени в химичната структура на веществото [2]. За това е важно веществата, които се използват в козметиката и фармацията да бъдат тествани за фотобезопасност. Съществуват два различни механизма на фототоксичност предизвикана от фототоксични съединения [3]. Директната фототоксичност се наблюдава при взаимодействие между възбудените молекули на фототоксичното вещество с ендогенните биологични молекули, като междинните продукти на тази реакция са цитотоксични. При индиректния механизъм се освобождават нестабилни свободни радикали, при прехода от възбудено към основно състояние на фототоксичните молекули [4].

При тестовете за фототоксичност се използват изкуствени светлинни източници. Най-често използваните слънчеви симулатори са: въглеродна дъгова лампа, халогенна дъгова лампа, кварцова волфрамова халогенна лампа, ксенонова дъгова лампа, живачна ксенонова лампа и диодна лампа. Диодните симулатори са малки, леки, широкодостъпни, с ниско топлинно излъчване, икономични, имат стабилен спектър и др [5].

Целта на нашата работа е да бъде направена оценка за приложимостта на LED слънчев симулатор, при *in vitro* тест за безопасност на продукти с природен произход.

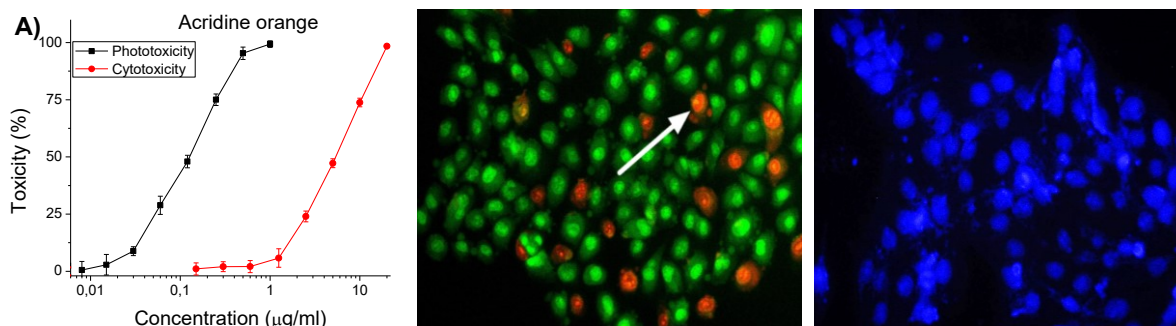
Използвахме акридин оранж (АО), радахлорин и етерично масло от здравец за валидиране на LED-слънчевия симулатор. След това теста за фотобезопасност беше приложен за изследване на хемоцианини и техни производни, върху ембрионални мишии фибробласти (BALB/c 3T3 clone A31) [6].

В това изследване бяха използвани спектрофотометрични, цитологични и микроскопски методи. Получените данни показаха сходство между спектъра на диодната лампа и слънчевата светлина при λ = от 360 до 950 nm. Измерената мощност е 0.64 J/cm², при разстояние от центъра на диодната матрица 25 cm.

При валидирането на слънчевият симулатор резултатите показаха, че при третиране с АО се наблюдава силен фототоксичен ефект, докато при маслото от здравец такъв ефект практически не се наблюдава. Стойностите на *Photo-irritation factor* (PIF) показаха съответствие с литературните данни за фототоксичността на тези вещества.

Флуоресцентната микроскопия бе извършена с двойно флуорохромиране (АО/PI) и DAPI. При концентрация на АО (IC₅₀) наблюдаваме клетки в начален и напреднал стадии на апоптоза (Фигура 1). При клетките третирани с Радахлорин наблюдавахме клетки в напреднал стадии на апоптоза с кондензиран хроматин.

При изследваните хемоцианини не бе регистриран цитотоксичен и фототоксичен ефект. Стойностите на PIF показват че хемоцианините не са фототоксични.



Фигура 1. Миши ембрионални фибробласти третирани с АО. А) Криви доза-отговор, В) Двойно флуорохромиране с АО/PI, С) Оцветяване с DAPI.

Литература:

- ¹ Elkeeb D, Elkeeb L, Maibach H., Cutan Ocul Toxicol., 2012, 31(4): 263–272.
- ² Ferguson J., Photodermatology, 1999, 155–169.
- ³ Kyuri K., Hyeonji P. and Kyung-Min L., Toxicol. Res., 2015, 31(2): 97-104.
- ⁴ Seto Y., Inoue R., Kato M., Yamada S., Onoue S., J. Photochem. Photobiol. B., 2013, 120: 44–51.
- ⁵ Stuckelberger M., Perruche B., Bonnet-Eymard M., Riesen Y., Despeisse M., Haug F., IEEE J. Photovolt, 2014, 4(5): 1282–1287
- ⁶ Test No. 432: In vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. OECD, Paris, 2004

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, ДО1-358/17.12.2020 и ДО1-278/03.12.2021.



ЛИПОЗОМНА ТЕРАПИЯ И ИМУНОДИАГНОСТИКА ПРИ ТРИХИНЕЛОЗА

Светлозара Петкова

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

Определянето на видовата принадлежност на трихинелните видове е важно както за медицината, така и за ветеринарните дейности във връзка с прогнозата за клиничното протичане на инфекцията при хората и за предприемането на ефикасни мерки за установяване на източника на инвазията.

За тази цел са разработени и приложени нови методи за скрининг, диагностика и терапия на мускулната фаза на трихинелоза чрез създаване и въвеждане в практиката на биосензор и имунолипозомен диагностикум (течен и лиофилизиран) с подобрени диагностични параметри за приложение при скринингови полеви изследвания и лабораторна диагностика на трихинелоза.

Във връзка с липозомната терапия са разработени нови антитрихинелни средства на база мебендазол и албендазол, които се отличават с по-висока терапевтична ефективност в сравнение с рутинно използваните при експериментална мускулна трихинелоза. Получените резултати позволяват да се извърши оценка на риска от инвазия и да се създаде подходяща стратегия за контрол на заболяването.

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, ДО1-358/17.12.2020 и ДО1-278/03.12.2021.



РОЛЯТА НА HMGB1 В ЕПИТЕЛНО-МЕЗЕНХИМНИЯ КЛЕТЪЧЕН ПРЕХОД И ФОРМИРАНЕТО НА МЕТАСТАЗИ ПРИ ТУМОРНА ПРОГРЕСИЯ

Д-р Йордана Тодорова

*Институт по Молекулярна Биология, БАН
Ул.Акад.Георги Бончев, блок 21, София1113*

Ключови думи: HMGB1, епително-мезенхимен клетъчен преход, метастази

Участието на HMGB1 в епително-мезенхимната клетъчна трансформация (EMT) и неговото въздействие върху развитието на метастази привлича все повече вниманието на учените, занимаващи се с проблемите на рака. Отдавна известна е повишената експресия на HMGB1 в места на хронично възпаление, както и в различни типове рак. Ролята на HMGB1 в EMT е сложна и многостранна, тъй като както вътреклетъчните, така и извънклетъчните му функции допринасят за ефектите върху прогресията на тумора и формирането на метастазите.

Вътреклетъчно HMGB1 може да модулира експресията на транскрипционни фактори, свързани с EMT, например Snail, Slug и Twist, като по този начин насърчава потискане експресията на епителните и активиране на мезенхимните маркери. Тези транскрипционни фактори дирижират препрограмирането на генната експресия, което води до загуба на междуклетъчните адхезионни връзки и апикално-базалната полярност на епителните клетки и придобиване на миграционно-инвазивни свойства, характерни за мезенхимните клетки.

Извън клетката HMGB1 може да функционира като част от молекулярния модел, свързан с клетъчни увреждания (DAMP) и действа като ендегенен сигнал за опасност, когато е изхвърлен в извънклетъчното пространство в отговор на увреждане на клетката от механична травма, патоген или туморна трансформация. Екстрацелуларният HMGB1 може да се свързва с няколко рецептора, включително Toll-подобни рецептори (TLR) и рецептора за крайни продукти на гликиране (RAGE), задействайки сигнални пътища надолу по веригата, които насърчават процесите на EMT и формирането на метастази. Активирането на тези рецептори може да индуцира секрецията на провъзпалителни цитокини, матриксни металопроотеинази (MMP) и други фактори, които създават протуморогенна микросреда и улесняват инвазията и разпространението на туморни клетки. Освен това HMGB1-медираната EMT и метастазите се влияят от взаимодействията с туморната микросреда. HMGB1 може да насърчи събирането и активирането на имунни клетки, като макрофаги и супресорни миелоидни клетки, което от своя страна може да провокира EMT и да улесни инвазията на туморни клетки.

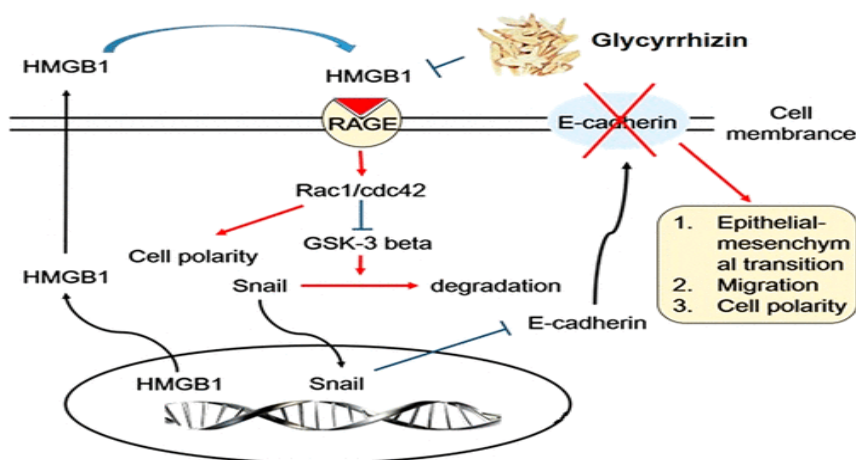
Освен това, HMGB1 може да взаимодейства с компоненти на извънклетъчния матрикс, като хиалурон и колаген, насърчавайки миграцията на туморни клетки, инвазията и колонизацията на други отдалечени органи. Въздействието на HMGB1 върху метастазите се простира отвъд неговите ефекти върху EMT, които са в процес на проучване. HMGB1 е участник в ангиогенезата, образуването на пред-метастатични

ниши и „избягването” от имунитета, като по този начин се подпомага още повече формирането и растежа на метастатични лезии.

Освен това клиничните проучвания показват, че повишените нива на HMGB1 в туморните тъкани или циркулиращия HMGB1 в кръвта са свързани с напреднали стадии на заболяването, повишен метастатичен потенциал и лоша прогноза при различни видове рак. Насочването към HMGB1 като терапевтична стратегия придобива все по-голям интерес и е обект на предклинични проучвания, изследващи ефикасността на HMGB1 инхибиторите или блокиращите антитела при потискане на EMT и инхибирането на метастази.

В заключение, HMGB1 играе важна роля в инициирането на епително-мезенхимния клетъчен преход и повлияването на метастазите при рак. Неговото участие обхваща както вътреклетъчни, така и извънклетъчни механизми, влияещи върху пластичността и инвазивните свойства на туморните клетки. Необходими са по-нататъшни изследвания на точните молекулни пътища, в които да се проследи ролята и взаимодействията на HMGB1 с другите молекули, участващи в трансформацията на клетките и развитието на метастази. Базирайки се на натрупаните научни данни, HMGB1 все повече се превръща в терапевтична цел при разработването на стратегии, насочени към предотвратяване на метастатична прогресия при пациенти с рак.

Фиг. 1. Участие на HMGB1 в инициация на епително-мезенхимен клетъчен преход.



Благодарности: Изказвам 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, ДО1-358/17.12.2020 и ДО1-278/03.12.2021, както и на проект № КП-06-Н51/13, 17.11.2021, ФНИ.

ЧОВЕШКИЯТ ИНТЕРФЕРОН ГАМА КАТО ПОТЕНЦИАЛЕН ИНХИБИТОР НА АКТИВНОСТТА НА SARS-COV-2: *IN SILICO* ПЕРСПЕКТИВА

Леандър Литов¹, Пейчо Петков¹, Мирослав Рангелов²,
Надежда Тодорова³, Елена Лилкова⁴, Невена Илиева⁴

¹ Софийски университет „Св. Кл. Охридски“, Физически факултет,
бул. „Джеймз Баучер“ 5, 1164 София

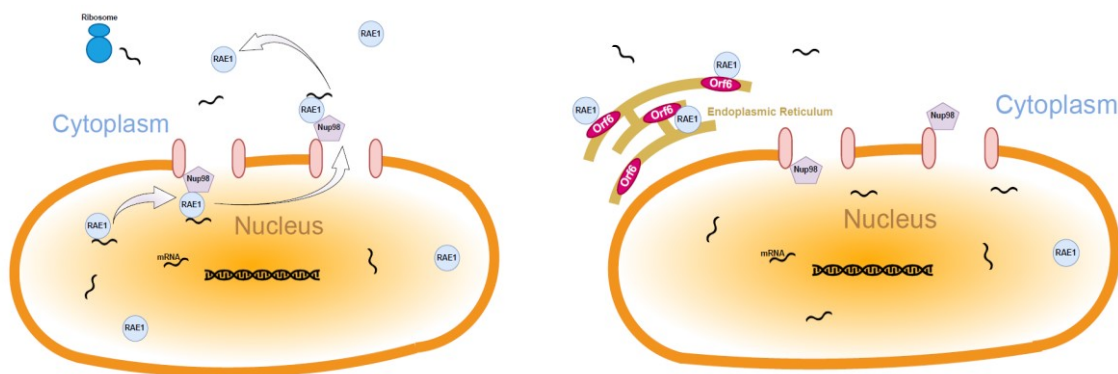
² Институт по органична химия с център по фитохимия - БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 9,
1113 София

³ Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания - БАН, ул. „Майор Юрий Гагарин“
№2, 1113 София

⁴ Институт по информационни и комуникационни технологии - БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл.
25А, 1113 София

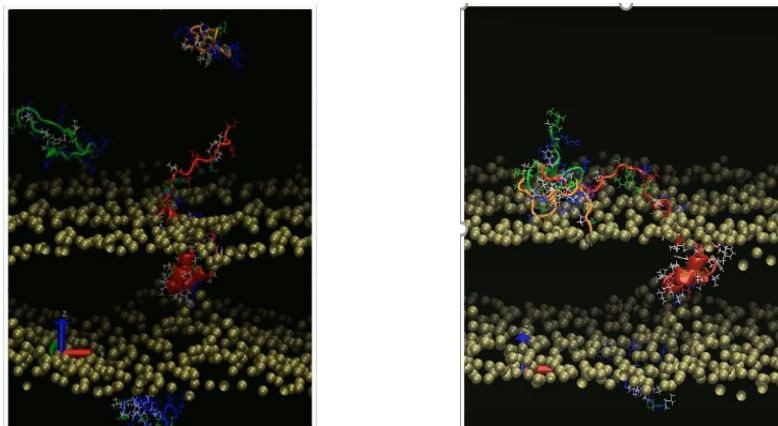
Ключови думи: молекулно моделиране, молекулна динамика, SARS-CoV-2, ORF6, вроден имунен отговор

Вирусът SARS-CoV-2 експресира 4 структурни, 16 неструктурни и 9 помощни протеина¹. Последните не са необходими за репликация в организма, но са отговорни за патогенността на вируса и потискането на вродения имунен отговор. Един от най-важните помощни протеини на SARS-CoV-2 е ORF6. Той е с дължина от 61 аминокиселини, който взаимодейства със сигналните пътища на тип-I интерферон,



Фигура 1. Схема на транспорта на иРНК от ядрото в цитоплазмата с участието на RAE1 и Nup98: (А) В нормални условия RAE1 се наблюдава в определена концентрация в ядрото и цитоплазмата; (Б) В клетки, експресиращи ORF6, в резултат на свързването си с него RAE1 се имобилизира върху ендоплазмения ретикулум. Това води до намаляване на концентрацията му в ядрото, което блокира транспорта на иРНК в цитоплазмата.

ключов компонент за противовирусния отговор на клетката домакин, чрез свързване с комплекса RAE1-NUP98². Предполага се, че силно киселинната С-крайна част на ORF6 е отговорна за това взаимодействие. ORF6 е най-токсичният протеин на вируса SARS-CoV-2 и съществено допринася за патологията на белите дробове при COVID-19. Това налага търсенето на възможни инхибитори на този протеин.



Фигура 2. Начална и крайна конформации на молекулно-динамична симулация на взаимодействието между вграден в моделна мембрана (ендоплазмен ретикулум) ORF6 и четири С-крайни пептида на човешки IFN γ .

Интерферон гама (hIFN γ) е важен имуномодулиращ цитокин, състоящ се от алфа-спирална глобула и два изключително гъвкави С-крайни участъка. Със своя основен характер³ те са перфектен кандидат за свързване и съответно деактивиране на киселинния С-край на ORF6. Посредством молекулно-динамично моделиране са изследвани възможностите за инхибиране на SARS-CoV-2 ORF6 от IFN γ хомодимер, както и от няколко пептида, идентични с С-терминалния домейн на цитокина. Нашите *in silico* експерименти показват, че тези молекули взаимодействат с висок афинитет поради силното електростатично привличане между тях (Фиг. 2). След свързване на С-крайните пептиди на IFN γ или на цялата молекула на цитокина, С-крайният домейн на SARS-CoV-2 ORF6 се имобилизира върху мембраната, което ефективно го неутрализира, препятствайки свързването му с RAE1. Това би следвало да доведе и до деблокиране на вродения имунен отговор на клетката⁴.

Литература:

- ¹ C. Bai, Q. Zhong, G. Gao, Science. China Life Sciences 2022, **65**, 280–294.
- ² T. Li, Y. Wen, H. Guo, T. Yang, H. Yang, X. Ji. Frontiers in Molecular Biosciences 2022, **8**, 813248
- ³ E. Lilkova, P. Petkov, N. Ilieva, E. Krachmarova, G. Nacheva and L. Litov. J. Mol. Mod. 2019, **25**, 127
- ⁴ L. Litov et al. “Insights into the SARS-CoV-2 ORF6 Mechanism of Action” (in preparation)

Благодарности: Това изследване е частично финансирано от Фонд „Научни изследвания“ по договор КП-06-ДК1/5/2021 SARSIMM. Авторите изказват благодарност за изчислителните ресурси, предоставени на суперкомпютъра Discoverer в рамките на Discoverer PetaSC и EuroHPC JU, както и на клъстера BioSim HPC във Физическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски“.

ЕЛЕКТРИЧНИЯТ ЗАРЯД В КОНТЕКСТА НА БИОЛОГИЧНАТА ФУНКЦИЯ: РАЗКАЗ ЗА ПЕПТИДИ

Невена Илиева¹, Пейчо Петков², Елена Лилкова¹, Леандър Литов²

¹ Българска академия на науките, Институт по информационни и комуникационни технологии, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 25А, 1113 София

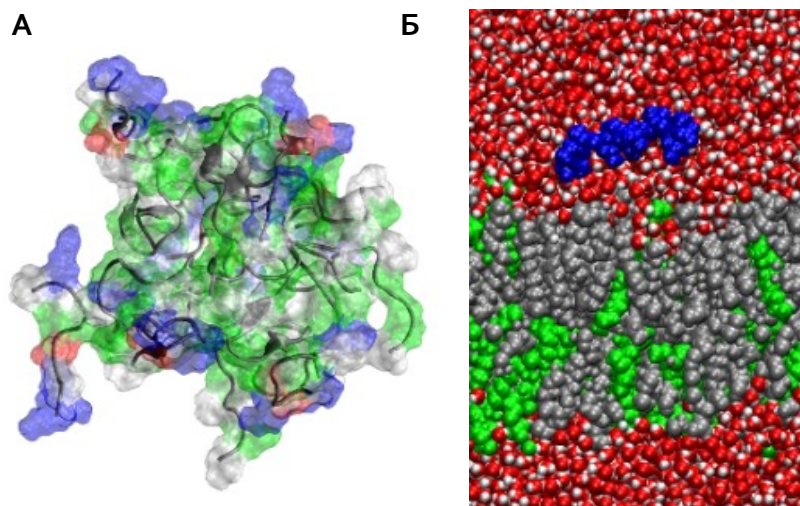
² Софийски университет „Св. Кл. Охридски“, Физически факултет, бул. „Джеймз Баучер“ № 5, 1164 София

Ключови думи: електростатични взаимодействия; хидрофобни взаимодействия; амфифилна среда; спонтанна самоорганизация; потенциални разлики; пептид-мембранно взаимодействие

Антимикробните пептиди (АМП) привличат значителен научен интерес през последните няколко десетилетия не само поради тяхната роля като първична защитна линия на практически всички живи организми срещу микробна инвазия¹, а и като потенциална база за разработване на иновативни медикаменти на фона на застрашително нарастващата бактериална резистентност към традиционните антимикробни средства². Общоприето е, че механизмът на действие на АМП се основава на тяхната катионна и амфифилна природа, която им позволява да взаимодействат с отрицателно заредени бактериални повърхности и мембрани, като причиняват разкъсване на мембраната или разстройват метаболитните процеси. Въпреки че повечето от АМП са катионни, съществуват и некаатионни АМП. Освен това, тъй като те се секретират като част от сложни многокомпонентни вещества с антимикробна активност, присъствието там на анионни, катионни, а също и неутрални компоненти трябва да се изследва във връзка с биологичната активност на въпросното вещество. Наред с това, открит е и въпросът кога АМП приемат своята биологично активна форма и как се доближават до целевата мембрана.

Тук ще представим *in silico* перспектива на нова концепция за механизма на действие на антимикробните пептиди, с акцент върху възможната биологична роля на некаатионните пептиди на примера на новоизолирани в лабораторията на проф. П. Долашка (ИОХЦФ-БАН) пептиди от фракцията с молекулно тегло под 3 kDa на слюзта на градинския охлюв *Helix aspersa*. Въз основа на продължителни молекуло-динамични и метадинамични симулации ние издигаме хипотезата^{3,4}, че линейните АМП се самоасоциират в телесните течности в наноразмерни агрегати в резултат на прецизен баланс между електростатичните и хидрофобни взаимодействия (Фиг. 1А). Тези агрегати (кълъстери) представляват перфектната транспортна система: позиционирането на хидрофобните незаредени остатъци в ядрото на кълъстера предотвратява взаимодействието с еукариотните мембрани с по-ниска повърхнинна плътност на заряда, а разположените върху повърхността на кълъстера заредени остатъци осигуряват електростатично взаимодействие с бактериалната мембрана. Освен това, стимулираното от амфифилната среда в агрегата пептидно нагъване позволява до целевата мембрана да

бъде доставена достатъчно висока локална концентрация на АМР във функционално активна конформация.



Фигура 1.

А. Максималният хетерогенен клъстер в двукомпонентен пептиден разтвор (базичните ака са оцветени в синьо, ацидните – в червено, полярните – в зелено, и неполярните – в бяло);
Б. *In silico* експериментална постановка за изследване на зависимостта на пептид-мембранното взаимодействие от заряда.

Нашите изследвания също така показват, че ефектът на заряда на АМР върху енергетиката на пептид-мембранното взаимодействие не е толкова еднозначен, колкото се предполага *a priori* (Фиг. 1Б). Докато положителният заряд е необходим за електростатичното насочване на АМР към целевата мембрана, наличието на неутрални хидрофобни домейни в молекулата/клъстера способства вграждането в мембраната чрез хидрофобния ефект, а отрицателно заредените домейни могат да бъдат от решаващо значение за процеса на проникването в мембраната и образуване на пори⁵.

Литература:

- ¹ N. Mookherjee, M.A. Anderson, H.P. Haagsman, D.J. Davidson, *Nature Rev. Drug Discovery* 2020, **19**, 311
- ² H.X. Luong, T.T. Thanh, T.H. Tran, *Life Sciences* 2020, **260**, 118407
- ³ P. Petkov, R. Marinova, V. Kochev, N. Ilieva, E. Lilkova, L. Litov, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2019, **7**, 1231
- ⁴ P. Petkov, E. Lilkova, N. Ilieva, L. Litov, *Int. J. Mol. Sci.* 2019, **20**, 5450
- ⁵ N. Ilieva, P. Petkov, E. Lilkova, L. Litov, *Studies Comp. Intell.* 9Springer, Cham, 2023; *in press*)

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, ДО1-358/17.12.2020 и ДО1-278/03.12.2021. Изчислителните ресурси са предоставени на високопроизводителния клъстер BioSim във Физическия факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“ и суперкомпютъра Discoverer PetaSC (чрез EuroHPC JU). Представените изследвания са частично подкрепени от Фонд „Научни изследвания“ по договор КП-06 ОПР-03-10/2018.



ЯМР СПЕКТРОСКОПИЯТА В ОТКРИВАНЕТО И РАЗРАБОТВАНЕТО НА ЛЕКАРСТВА ОТ ПРИРОДНИ ПРОДУКТИ

Николай Г. Василев^{1*}

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

Ключови думи: ЯМР, метаболити, мас спектрометрия, пептиди, слуз, хемолимфа, *Helix aspersa*, *Helix lucorum*, *Rapana venosa*,

Ядрено-магнитният резонанс (ЯМР) е най-мощният метод да доказване на структурата на неизвестни вещества в разтвор. Ще бъде направено въведение в основните спектрални техники, които рутинно се използват в Центъра по ЯМР спектроскопия на Института по Органична химия с Център по фитохимия към БАН. Ще бъдат представени някои от основните приложения на ЯМР спектроскопията при откриването на лекарства, като фокуса ще бъде върху компетенциите на учените в Центъра по ЯМР спектроскопия за разработване и приложение на съвременни ЯМР спектрални подходи в течна, твърда и междинна фаза. Представени са примери в областта на структурния анализ и стереохимия на синтетични органични молекули, молекулна подвижност ¹, дифузионна ЯМР спектроскопия ², ЯМР спектроскопия с *in situ* облъчване ³, анализ на екстракти от медицински и ароматни растения ⁴, приложение на пространствено-селективни експерименти ⁵. ЯМР спектроскопията може да се приложи и за скрининг на лекарствени средства ⁶.

ЯМР спектроскопията е една от трите основни аналитични техники, използвани в метаболомиката (другите две са газова хроматография, съчетана с масспектрометрия (ГХ-МС) и течна хроматография, съчетана с едноетапна масспектрометрия (ТХ-МС). Относителната лекота на подготовка на пробите, възможността за количествено определяне на нивата на метаболитите, високото ниво на експериментална възпроизводимост и присъщата недеструктивна природа на ЯМР спектроскопията са я направили предпочитана платформа за дългосрочни или широкомащабни клинични метаболомни изследвания. Тези предимства обаче често се компенсират от факта, че повечето други аналитични техники, включително както ТХ-МС, така и ГХ-МС, по своята същност са по-чувствителни от ЯМР, като по-ниските граници на откриване обикновено са 10 до 100 пъти по-добри.

Предимствата и недостатъците на ЯМР спектроскопията за метаболомни изследвания ще бъдат дискутирани и като примери ще бъдат представени скорошни изследвания в рамките на проекта БиоАктивМед.

Метаболитно профилиране на базата на ¹H ЯМР спектроскопия беше приложено с цел да се изследва функционалната роля на метаболитите в лиофилизирана слуз от градински охлюв *Helix aspersa*. Двадесет метаболита бяха недвусмислено идентифицирани чрез 1H, 1D TOCSY, 2D J-разрешени, 2D COSY и 2D HSQC NMR спектри с потискане на водата. Разработеният протокол за определяне на метаболити в слуз от *H. aspersa* чрез ЯМР спектроскопия ⁷ беше приложен за изследване на фракциите с ниско молекулно тегло на хемолимфа от *H. lucorum* (<1kD и <3kD) и четиринадесет метаболита бяха недвусмислено идентифицирани ⁸. Същият протокол беше приложен

към фракциите с ниско молекулно тегло на хемолимфа от *R. venosa* (<3kD) и единадесет метаболита бяха недвусмислено идентифицирани.

NMR/MS metabolite profiling



Фигура 1. ЯМР/МС метаболитно профилиране на лиофилизирана слюз от градински охлюв *Helix aspersa*.

Литература: ¹ M. Dangelov, M. Stoyanova, P. Petrov, M. Putala, N. G. Vassilev, J. Organomet. Chem., 2016, 817, 1. ² P. Denkova, D. Momekova, St. Rangelov, N. Lambov, R. Willem, J. Control. Release, 2010, 148, e47. ³ N. Toncheva-Moncheva, M. Dangelov, N.G. Vassilev, C.P. Novakov, RSC Advances, 2020, 10, 25214. ⁴ P. Dimitrova, K. Alipieva, T. Grozdanova, S. Simova, V. Bankova, M. I. Georgiev, M. P. Popova, Food Chem. Toxicol., 2018, 111, 605. ⁵ Y. Mitrev, S. Simova and D. Jeannerat, Chem. Commun., 2016, 52, 5418. ⁶ L. Shi, N. Zhang, Applications of Solution NMR in Drug Discovery, Molecules, 26, 576 (2021). ⁷ N. G. Vassilev, S. D. Simova, M. Dangelov, L. Velkova, V. Atanasov, A. Dolashki, P. Dolashka, Metabolites, 2020, 10, 360. ⁸ N. G. Vassilev, S. D. Simova, M. Dangelov, L. Velkova, V. Atanasov, A. Dolashki, P. Dolashka, Bulg. Chem. Commun., 2021, 53A, 49.

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, ДО1-358/17.12.2020 и ДО1-278/03.12.2021.

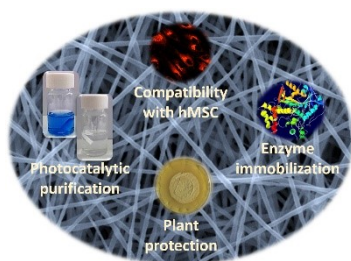
ХИБРИДНИ ВЛАКНЕСТИ ПОЛИМЕРНИ МАТЕРИАЛИ С НАСОЧЕН ДИЗАЙН И ПРИЦЕЛНИ СВОЙСТВА

Оля Стоилова*

Лаборатория Биологично активни полимери, Институт по полимери,
Българска академия на науките, 1113 София, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 103А

Ключови думи: електроовлакняване, хибридни полимерни материали, пречистване на води, тъканно инженерство и регенеративна медицина

Авангардната технология електроовлакняване (от англ. „*electrospinning*“) привлича все по-голям интерес поради факта, че предлага лесно, евтино и ефективно получаване на ново поколение напреднали полимерни материали (т. нар. „матове“) с уникални свойства – изключително висока специфична повърхност, лекота и порьозност. Нещо повече, електроовлакняването позволява създаването на матове с разнообразна морфология от полимери в комбинация както с органични, така и с неорганични съединения. В тази връзка, докладът е посветен на получаването на иновативни хибридни полимерни материали с насочен дизайн, контролирана структура и желани свойства за точно определени приложения [1-5]. Наред със създаването на ново поколение полимерни материали чрез високотехнологични и иновативни подходи, ще бъдат представени и създадените в Лаборатория Биологично активни полимери набор от оригинални апаратури за електроовлакняване и приспособления към тях.



Една от насоките, която ще бъде представена е нов оригинален подход за получаване на различни по дизайн влакнести хибридни полимерни материали с включени неорганични съединения (TiO_2 , Fe_3O_4 , наноглини и др.) с потенциално приложение за пречистване на води от органични замърсители или йони на тежки метали. Ще бъдат представени и възможностите за създаване на влакнести материали като биокompatibilни подложки за тъканното инженерство и регенеративната медицина. Накрая ще бъде представен и оригинален подход за лесно получаване на биоматериали със запазена влакнеста структура, контролирано поддръждане на влакната и подобрени механични свойства.

Литература: ¹Tsekova et al. *Polymers*, 2022, 14(23), 5070; ²Stoilova et al. *Polymers*, 2021, 13(22), 3923; ³Borisova et al. *J. Polym. Res.*, 2021, 28(1), 10; ⁴Borisova et al. *Polymers*, 2020, 12(3), 693; ⁵Korina et al. *J. ESE*, 2018, 6(2), 2075.

Благодарност: Авторът изказват своята благодарност за финансовата подкрепа по проект BG05M2OP001-1.001-0008 „Национален център по мехатроника и чисти технологии“, финансиран от ОП-НОИР, съфинансирана от ЕС чрез ЕФРР.



КАК ДА ИЗСЛЕДВАМЕ АНТИМИКРОБНИ ПЕПТИДИ

Пейчо Петков^{1*}, Елена Кръчмарова^{2*}, Стефка Танева³, Геновева Начева²,
Леандър Литов¹, Елена Лилкова⁴, Невена Илиева⁴

¹ Софийски университет „Св. Кл. Охридски“, Физически факултет,
бул. „Джеймс Баучър“ 5, София 1164

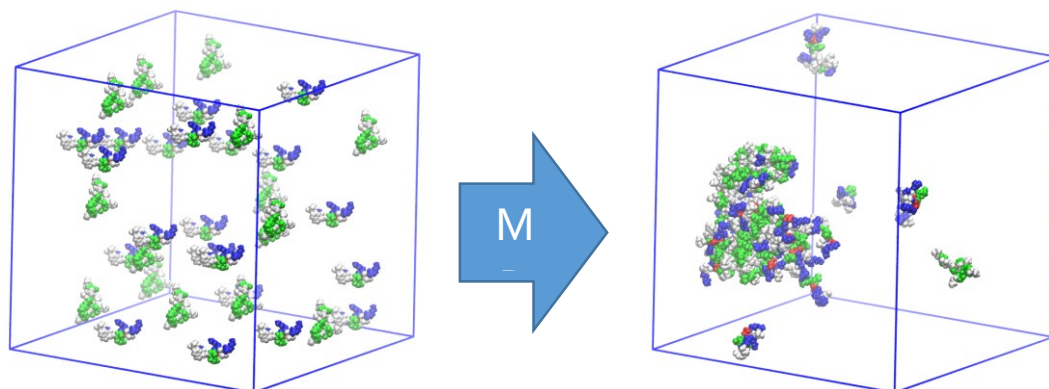
² Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ – БАН,
ул. „Акад. Г. Бончев“, Блок 21, София 1113

³ Институт по биофизика и биомедицинско инженерство – БАН,
ул. „Акад. Г. Бончев“, Блок 21, София 1113

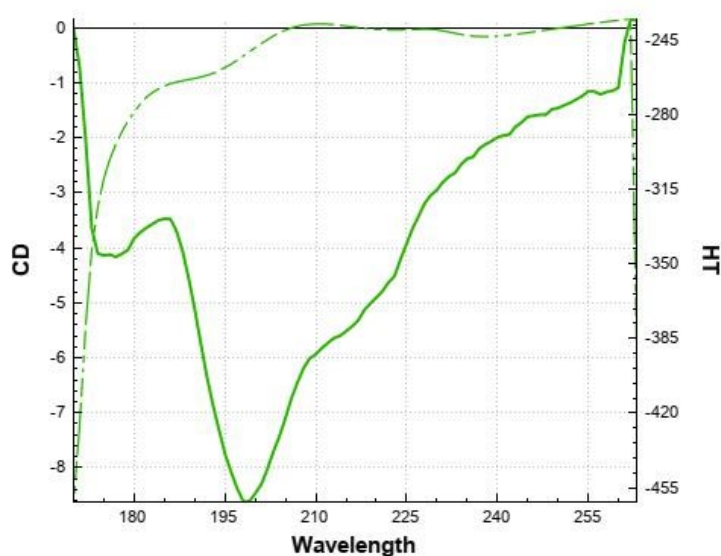
⁴ Институт по информационни и комуникационни технологии – БАН,
ул. „Акад. Г. Бончев“, Блок 2, София 1113

Ключови думи: *in silico* експерименти, молекулно моделиране, молекулна динамика, динамично разсейване на светлината, кръгов дихроизъм

Антимикробните пептиди са обещаваща алтернатива на традиционните антибиотици в борбата с инфекциите. Механизмът на действие на тези малки предимно катионни и амфифилни молекули все още не е напълно разбран. Предполага се, че процесите на самоорганизация на антимикробните пептиди в процеса на секретирание, преди да атакуват клетъчните мембрани на патогенните микроорганизми, имат решаваща роля за действието им. На примера на два антимикробни пептида от слуз на градински охлюв *Helix aspersa*, изолирани наскоро в лабораторията на проф. П. Долашка (ИОХЦФ-БАН), ще бъдат представени някои подходи за изучаване на структурата и действието им с помощта на молекулно моделиране и биофизични методи. Ще бъдат обсъдени прилагането на метода на молекулната динамика за изследване на процесите на самоорганизация и ролята на този подход в планирането на експерименти и обясняването на експериментални резултати. Ще бъдат представени експерименталните техники динамично разсейване на светлината и кръгов дихроизъм. Ще се обърне внимание на процеса на ко-дизайн т.е. теоретични изследвания, експериментални резултати, подобряване на теоретичния модел и др., което в дадения случай цели изясняване на механизмите на действие на антимикробните пептиди.



Фигура 1. Моделиране на процеса на агрегиране в двукомпонентен разтвор на предполагаеми антимикробни пептиди от слуз на градински охлюв. Начално състояние (ляво) и крайно състояние (дясно) на молекулно-динамична симулация



Фигура 2. Кръгов дихроизъм на двукомпонентен воден разтвор на антимикробни пептиди от слуз на градински охлюв.

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, ДО1-358/17.12.2020 и ДО1-278/03.12.2021, на високопроизводителния клъстер BioSim във Физическия факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“ и на Discoverer PetaSC (чрез EuroHPC JU) за предоставените изчислителните ресурси и на синхротронния център SOLEIL (St. Aubin, France) за предоставеното ускорително време на снопа DISCO. Представените изследвания са частично подкрепени от Фонд „Научни изследвания“ по договор КП-06 ОПР-03-10/2018.

ИНДУКЦИЯ НА КЛЕТЪЧНА СМЪРТ ПРИ ОЦЕНКА НА АНТИНЕОПЛАСТИЧНИЯ ЕФЕКТ НА НИСКТОКСИЧНИ БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ВЕЩЕСТВА

Спиро Константинов^{1*}

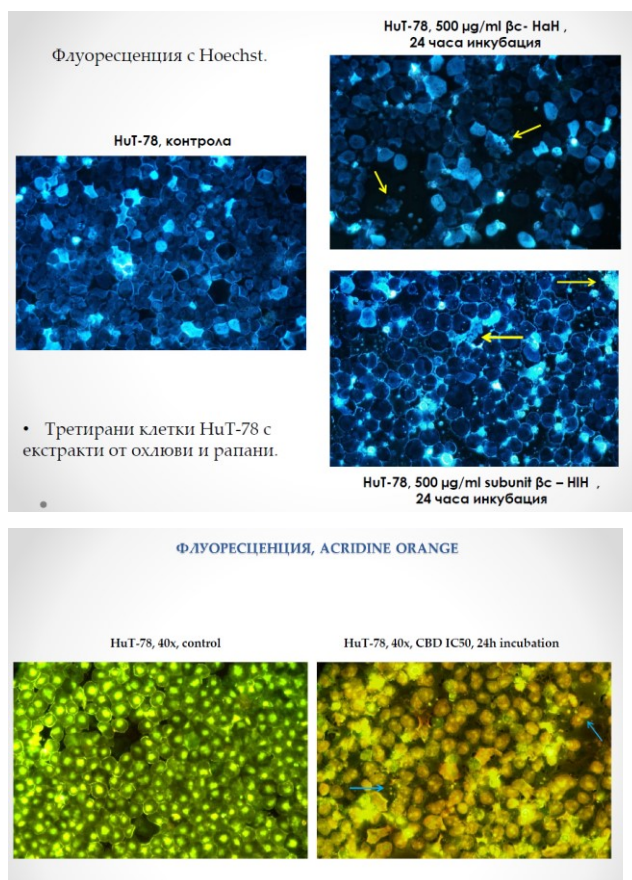
^{1*} *Фармацевтичен факултет, Медицински Университет София, България*
Кат. „Фармакология, фармакотерапия и токсикология“; e-mail: skonstantinov@pharmfac.mu-sofia.bg

Ключови думи: антинеопластична активност, апоптоза, автофагия, методи за детекция на вида клетъчна смърт, нуклеарна фрагментация, олигонуклеозомална ДНК-фрагментация, индукция на LC3B, метаболизъм и фрагментиране на PARP

Индукцирането на физиологична клетъчна смърт (апоптоза) е стандартна цел на изследването на всяко ново средство с противотуморна активност. Апоптозата и автофагията играят ключова роля по отношение на клетъчната хомеостаза във всеки орган от човешкото тяло. Всъщност апоптозата канонично се означава като тип I клетъчна смърт. От друга страна автофагията се разглежда като процес, подпомагащ оцеляването, но при вариант на ексцесивна индукция може да се окаже механизъм на клетъчна смърт, озаначаван като тип II. Счита се, че при развитие на малигнен процес е налице дисрегулация на тези две форми на клетъчна смърт и нарушаване на равновесието между тях. Това налага детайлното изследване на тези два процеса с оглед на терапевтичната използваемост на новоизследваните вещества, независимо от тяхната ниска токсичност. Повечето таргетни и класически химиотерапевтични средства репрограмират туморните клетки да претърпят апоптоза или токсична автофагично-медирана клетъчна смърт. Заснемането на морфологичните промени, настъпващи след индукция на клетъчна смърт под въздействието на различни агенти играе ключова роля при изясняване на механизма им на действие, както и по отношение на тяхната туморна селективност. Флуоресцентните багрила, взаимодействащи с нуклеиновите киселини като бисбензимид, пропидиев йодид и акридиново оранжево способстват за визуализиране на нуклеарните промени, промените в пропускливостта на клетъчната мембрана и формирането на кисели лизоавтофагозоми (фиг. 1). Олигонуклеозомалната ДНК-фрагментация е феномен, който не е задължителен, но представлява патогномоничен белег на активираната апоптоза. Съществуват различни подходи за детекция на типичните кратни на 200 чифта бази хистон-асоциирани фрагменти – агарозна електрофореза на ДНК от цитозолната фракция на претърпяли апоптоза клетки, специфична ELISA и други. Типично за различните подвидове на програмираната клетъчна смърт е активирането на прокаспазии 8 и 9, което може да бъде анализарно с помощта на класически имуноблот. Метаболизирането и фрагментирането на PARP е друг важен биомаркер на апоптозата, който също подлежи на имуноблотен анализ. Автофагичният биомаркер лека верига 3 (LC3) първоначално е идентифициран като субединица на микротубулните асоциирани протеини 1 A и 1B (означавани като MAP1LC3). Като метод за оценка на индуцираната автофагична клетъчна смърт ще бъде

представено индуцирането на протеина LC3B при лимфомни туморни клетки след въздействие с различни по механизъм на действие антинеопластични агенти.

Комплексното изследване на цитотоксичния ефект, колония-образуващата способност, повторното прорастване на монослой при тест с „одраскване“, както и получаването на данни относно вида на индуцираната форма на клетъчна смърт способства за адекватното оценяване на нискотоксични биологично активни вещества за прецизна медицина с антинеопластични свойства.



Фигура 1. Морфологични промени при индукция на клетъчна смърт с природни вещества и екстракти.

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, ДО1-358/17.12.2020 и ДО1-278/03.12.2021.

ПОСЛЕДНИ НОВОСТИ В БИОПРОИЗВОДСТВОТО НА РЕКОМБИНАНТНИ БЕЛТЪЦИ

Шазие Юсеин-Мяшкова¹

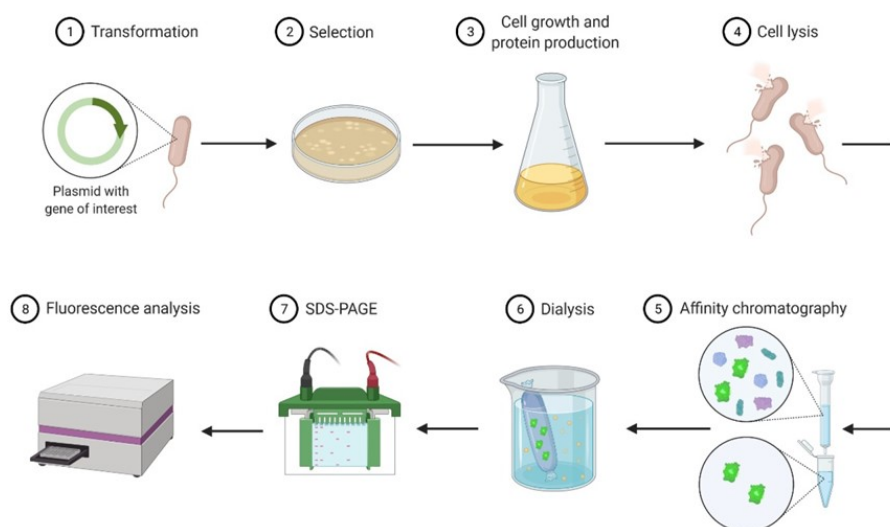
¹Институт по молекулярна биология „Румен Цанев“, БАН, София, ул. Акад. Г. Бончев бл. 21

Ключови думи: рекомбинантни белтъци, изолиране, пречистване, вектори

Рекомбинантните белтъци са изкуствено синтезирани белтъци, намират множество приложения в биомедицинските изследвания: като терапевтични молекули в състава на лекарства, като антигени при производството на ваксини, в диагностичните тестове, в изследването на структурата и функцията на белтъците в клетката, белтък-белтъчните взаимодействия и други процеси. Рекомбинантните белтъци се продуцират в живи клетки: както прокариотни, така и еукариотни и в зависимост от „домакина“ се използват подходящите вектори за клонирането на гена, който ги кодира (плазмиди, вируси, космиди). Пречистването им се основава на различните физикохимични свойства на белтъка, като размер, заряд и хидрофобност.

По време на лекцията ще бъдат разгледани последните нововъведения по отношение на видовете вектори, клетъчни системи за размножаване, както и етапите на пречистването.

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, ДО1-358/17.12.2020 и ДО1-278/03.12.2021.



Фигура 1. Схема на пречистване на рекомбинантен протеин от *E. coli* (източник: <https://www.mdpi.com/2079-7737/11/3/387>)



МЛАДЕЖКА КОНФЕРЕНЦИЯ

ДОКЛАДИ



ДВА МОЛЕКУЛЯРНИ ПОДХОДА ЗА ИЗУЧАВАНЕ СТРУКТУРАТА НА БАКТЕРИАЛНИТЕ СЪОБЩЕСТВА

Радина Николова^{1*}, Кирил Кирилов¹, Николай Динев², Анелия Кенарова³, Галина Радева¹

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

²Институт по почвознание, агротехнологии и защита на растенията "Никола Пушкиarov", Селскостопанска академия, ул. „Шосе Банкя“ 7, София 1331

³Софийски университет "Св. Климент Охридски", Биологически факултет, Катедра „Екология и опазване на околната среда“, ул. "Драган Цанков" 8, София 1164

Ключови думи: почва, тежки метали, 16S рРНК ген, таксономичен профил

Целта на изследването е да се проследи промяната в структурата на почвените бактериалните съобщества чрез два молекулярни подхода: (1) конструиране на 16S рРНК генни клонови библиотеки и (2) таргетно метагеномно секвениране на 16S рРНК ампликони (V3-V4 регион) с платформата Illumina MiSeq (Фигура 1).

Избраните два молекулярни метода определят състава и промените в структурата на бактериалните съобщества с различна чувствителност.

Обект на изследването са замърсени с тежки метали почвени проби от района на КЦМ Груп 2000, Пловдив. Пробовземането е направено от повърхностен слой на пет точки по градиента на замърсяване с Pb, Zn, Cd, Cu и As, както следва: КСМ_1 (силно замърсена) > КСМ_4 > КСМ_2 > КСМ_5 (средно замърсена) > КСМ_3 (слабо замърсена).

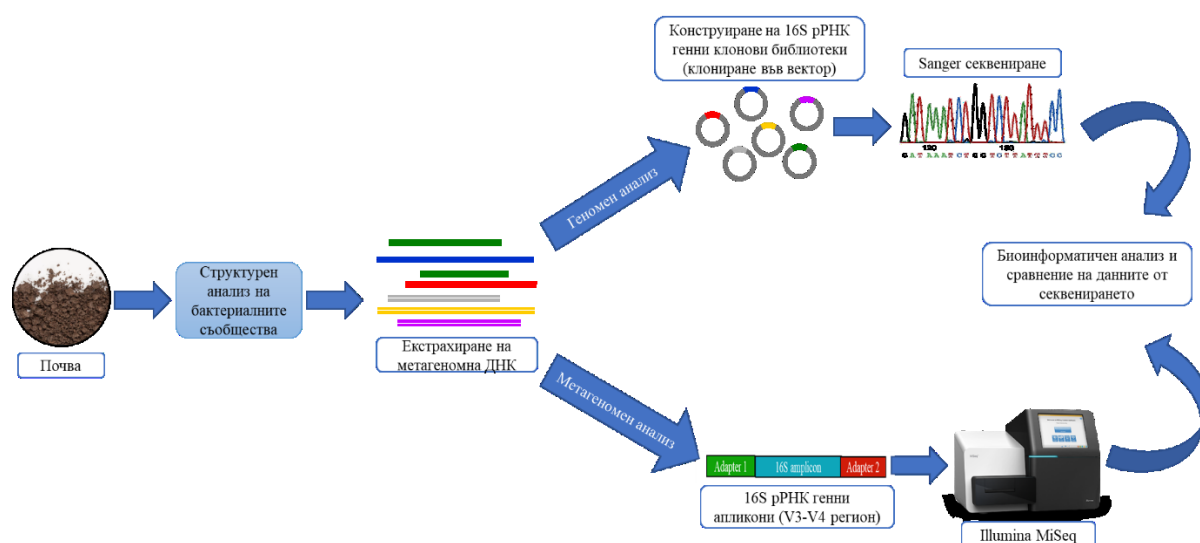
Геномният анализ на бактериалните съобщества в почвите показва наличието на десет отдела: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Fibrobacteres*, *Verrucomicrobia*, и *Planctomycetes*.

Proteobacteria са доминантни във всички почви (31-75%), с изключение на слабо замърсената почва КСМ_3 (27%), където доминира *Actinobacteria* (31%). *Actinobacteria* присъства в изследваните почви (3-23%), с изключение на средно замърсената почва КСМ_5, която се характеризира с ниско разнообразие и наличие на само три отдела.

На ниво вид са идентифицирани 14 бактериални видове, принадлежащи към *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*proteobacteria, *Firmicutes* и *Actinobacteria*.

Метагеномният анализ на почвените бактериалните съобщества показва 11 основни отдела: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Nitrospirae* и *Saccharibacteria*. Установено е, че *Proteobacteria* е доминиращият отдел във всички почви (27-42%), следван от *Actinobacteria* (15-23%) и *Acidobacteria* (5.85-17%).

При сравнение на резултатите от двата молекулярни метода е установено, че метагеномният подход показва наличие на два допълнителни основни отдела *Nitrospirae* и *Saccharibacteria* и не класифицира *Fibrobacteres* като основен отдел.



Фигура 1. Схематично представяне на двата молекулярни метода за изучаване структурата на бактериалните съобщества в почви, замърсени с тежки метали от района на КЦМ 2000 Груп.

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, ДО1-358/17.12.2020 и ДО1-278/03.12.2021.

НАТ1 КАТО КАНДИДАТ ЗА НОВА АЦИЛ-ТРАНСФЕРАЗА

Соня Станева^{1*}, Ива Угринова¹, Саади Кошбин²

¹Институт по молекулярна биология „Академик Румен Цанев“ – БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“ бл.21, 1113 София

²Institute for Advanced Biosciences, Grenoble, Site Santé - Allée des Alpes
38700 La Tronche

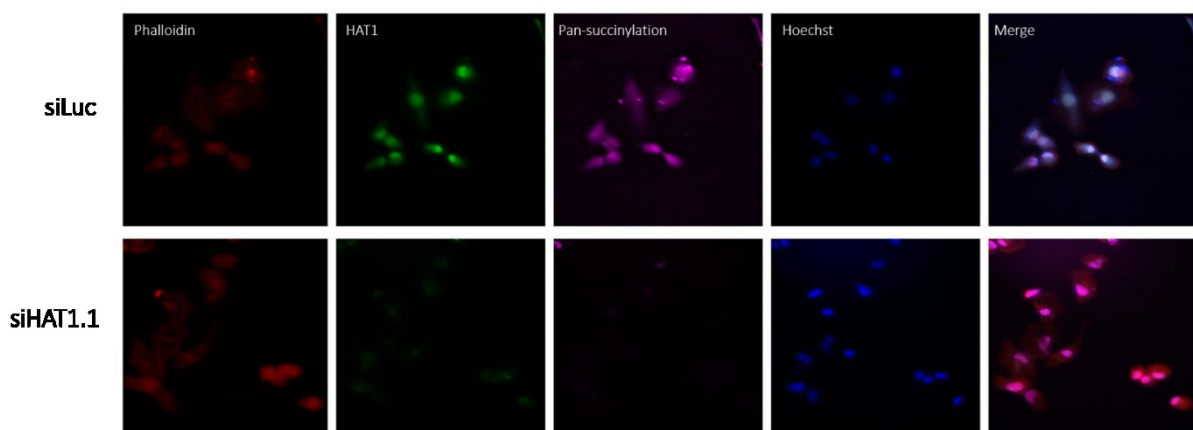
Ключови думи: Ацетилна група, Пост-транслационна модификация, Хистон, Междинен метаболит, Хистон ацетил-трансфераза 1

Хистон ацетил-трансферазите са семейство от ензими, отговорни за ацетилирането на лизинови остатъци на белтъци използвайки кофактора ацетил коензимА (Ас-СоА). Някои от представителите на семейството са отговорни за ацетилирането на хистони и осъществяването на регулация на транскрипцията и са основни участници в епигенетичния контрол. Хистон ацетил-трансфераза 1 (НАТ 1) е член на това семейство и медира ацетилирането на новосинтезирани хистони H3 и H4 в цитоплазмата преди тяхната ядрена локализация и асемблирането им в нуклеозоми. НАТ1 винаги ацетилира H4 на позиции K5 и K12 като тези модификации биват премахнати след ядрената локализация на хистона. Тези модификации са еволюционно консервативни. Противно на логичното предположение, че това ацетилиране е сигнал за ядрена локализация, опити ясно сочат, че както при субституция на лизина в H4 с аргинин, така и при премахване на цялата му NH₂ опашка, същите събития протичат без усложнения – хистонът се локализира в ядрото и асемблира нуклеозома. (1)

По време на S-фазата, клетката синтезира много повече хистони, отколкото използва, поради големия риск от недостиг на такива. Акумулирането на хистони в цитоплазмата е вредно за клетката. Бидейки положително заредени, те могат да се свържат неспецифично с РНК и отрицателно заредени белтъци и да образуват агрегати, които са токсични за клетката. Те трябва да бъдат разградени. Множество процеси в клетката налагат деградация на хистони. Пример за това е стъпката на елонгиран сперматид по време на сперматогенезата. В този процес се наблюдава хиперацетилиране на всички ядрени хистони, последвано от тяхната евикция и заменянето им от протамини и транзиционни протеини. В скорошен труд се доказва необходимостта от действието на НАТ1 върху белтъка вперин за неговото разграждане. Без него, вперинови молекули акумулират в клетката и я увреждат. Ацетилирането е сигнал, който насочва белтъка към протеазомата. (2)

НАТ1- медираното ацетилиране на новосинтезирания хистон H4 може да има влияние върху контрола на дозите на свободните хистони, тяхната деградация и синтеза.

Резултатите ни изтъкнаха НАТ1 като ензим, медиращ други посттранслационни модификации различни от ацетилиране, известни под общото име ацилации. Още повече, след knock-down на НАТ1, нивата на ацетилиране на белтъци в клетката не бяха променени, което сочи, че НАТ1 не е ключова ацетил-трансфераза. Тези данни биха могли да потвърдят инициалната ни хипотеза и да я разширят до контрол и разграждане на други, различни от хистони белтъци, посредством ацилации.



Фигура 1. След К.Д на HAT1 в клетъчна линия H1299, пан-сукцинилирането изчезва.

Литература: ¹ K. Luger, M. L. Dechassa, and D. J. Tremethick, “New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair?,” Nat. Rev. Mol. Cell Biol., no. 7, pp. 436–447, Jun. 2012, vol. 1, pp. 436–447

² A. Goudarzi, H. Shiota, S. Rousseaux, and S. Khochbin, “Genome-scale acetylation-dependent histone eviction during spermatogenesis,” J. Mol. Biol., Oct. 2014, vol. 426, no. 20, pp. 3342–3349,

Благодарности: Авторите изказват своята благодарност към 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, ДО1-358/17.12.2020 и ДО1-278/03.12.2021.

ОЦЕНКА НА АНТИТУМОРНАТА-АКТИВНОСТ НА ВОДНИ ЕКСТРАКТИ ОТ *CHROOCOCCUS SP.*

Инна Суликовска^{1*}, Ани Георгиева¹, Иван Илиев¹, Таня Тошкова-Йотова², Иван Илиев², Ренета Тошкова¹

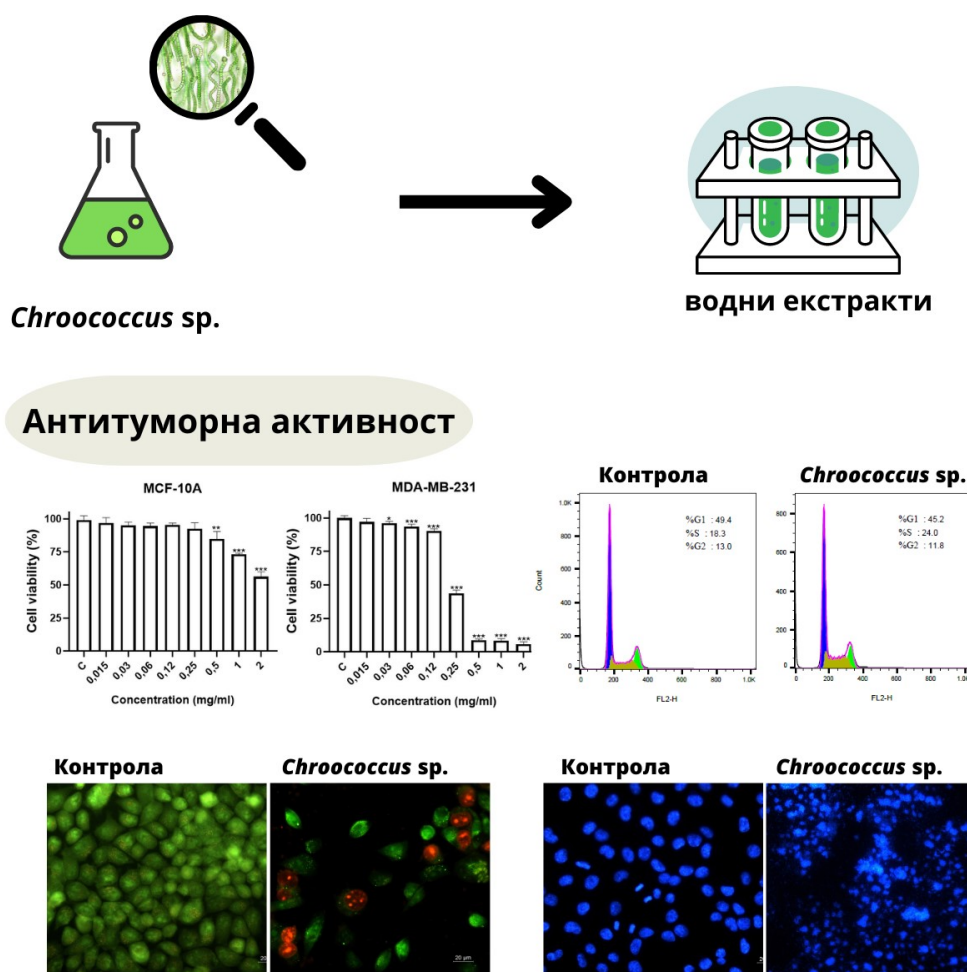
¹Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей, Българска академия на науките, София 1113, България

²Институт по физиология на растенията и генетика, Българска академия на науките, София 1113, България

Ключови думи: *Chroococcus sp.*, анти tumorна активност, селективност, апоптогенни ефекти.

Нарастването на заболяемостта от рак и ограниченията на съществуващите терапевтични подходи и средства подчертават необходимостта от идентифициране на нови биоактивни съединения за разработване на нови анти tumorни препарати. Цианобактериите (синьо-зелени микроводорасли) са широко разпространени грам-отрицателни, фотоавтотрофни прокариоти, които са разпознати като важен източник на биологично активни вторични метаболити. Разработени са методи за тяхното култивиране, а също и за извличане и пречистване на различни фитохимични продукти с потенциал за приложение в различни сфери на биомедицината и козметологията. Целта на настоящото изследване е да се проучи анти tumorната активност на нискотемпературен и високотемпературен воден екстракт от *Chroococcus sp.* върху панел от човешки tumorни клетъчни линии. *In vitro* антипролиферативната активност на екстрактите е определена чрез NRU-тест, а влиянието им върху разпределението на клетките в различни фази на клетъчния цикъл е изследвано с помощта на проточна цитометрия. Морфологичните промени в tumorните клетки, индуцирани в резултат на третиране с екстракти от *Chroococcus sp.* са изследвани чрез флуоресцентна микроскопия. Резултатите от проведените изследвания показват, че високотемпературният екстракт проявява по-висока противотumorна активност в сравнение с нискотемпературния. От изследваните tumorни клетъчни линии, използвани като *in vitro* модели на някои от най-често срещаните онкологични заболявания, най-висока чувствителност към действието на изследваните екстракти е установена при клетъчните линии MCF-7 и MDA-MB-231, получени съответно от ниско и високо инвазивен карцином на млечна жлеза. Проведеният проточно цитометричен анализ не показва статистически значима промяна в процентното съотношение на раковите клетки в отделните фази на клетъчния цикъл. Цитоморфологичните изследвания показват, че намаляването на клетъчната жизненост на tumorните клетки се дължи както на потискане на пролиферативната активност, така и на индуциране на апоптоза. Това проучване разкрива *Chroococcus sp.* като потенциален източник на ценни фитохимични съединения с противотumorно действие.

Фигура 1. Антитуморна активност на екстракти от *Chroococcus sp.*



Благодарности: Изследванията са частично подпомогнати от Националната програма на МОН „Млади учени и пост-докторанти 2“ одобрена с РМС 206/07.04.2022г. и от 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, ДО1-358/17.12.2020 и ДО1-278/03.12.2021.



ПОЛУЧАВАНЕ НА ИНЖЕКЦИОНЕН НАНОКОМПОЗИТЕН IN SITU ХИДРОГЕЛ ЗА ДОСТАВЯНЕ НА КАНАБИДИОЛ

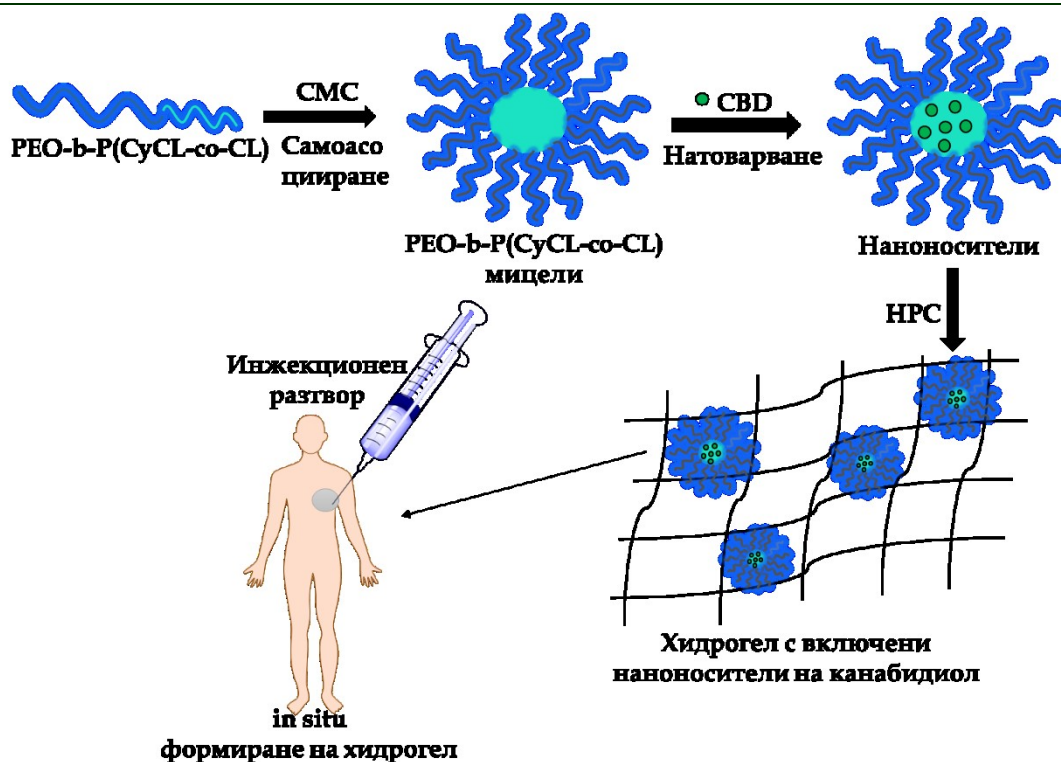
Катя Каменова*, Анна Пранчева, Георги Грънчаров, Петър Петров
Институт по полимери, ул. „Акад. Георги Бончев“, бл.103, вх. А
**E-mail: kkamenova@polymer.bas.bg*

Ключови думи: полимерни мицели, наноносители, хидрогел, канабидиол

Канабидиолът (CBD) привлича все по-голям интерес поради терапевтичния си потенциал за лечение на множество заболявания. Въпреки това, CBD е много липофилен, има много неблагоприятна фармакокинетика и ниска бионаличност. Усилията са насочени към разработване на системи за доставяне на лекарства за повишена солубилизация и терапевтична активност на CBD. Наноносителите имат редица предимства като системи за доставяне на лекарства, включващи биосъвместимост, биоразградимост, стабилност, висок капацитет на натоварване и контролирано освобождаване в целевите клетки. От друга страна, хидрогелите са омрежени 3D структури, които притежават забележителни свойства като набъбване, механична якост, пропускливост и биосъвместимост. Инжекционните in situ хидрогелове се прилагат в течна форма и след инжектиране се трансформират в гел чрез бърз фазов зол-гел преход, улеснявайки локалното приложение на този тип терапевтици. Включването на наноносители в хидрогелове е иновативен подход за разработване на системи за доставяне на лекарствени вещества, чрез който се комбинират полезните характеристики на повече от един носител, което води до подобрени и синергични терапевтични ефекти.

Настоящото проучване се фокусира върху разработването на инжекционен нанокомпозилен in situ хидрогел за контролирано доставяне на канабидиол. Системата беше получена чрез включване на CBD посредством хидрофобни взаимодействия в ядрата на мицелни наноносители от амфифилни поли(етиленов оксид)-*бл*-поли(α -цинамил- ϵ -капролактон-*съ*- ϵ -капролактон) (PEO-*b*-P(CyCL-co-CL)) дблокови съполимери, след което мицелната форма на канабидиол беше директно включена в хидрогел от хидроксипропилцелулоза (HPC) (Фигура 1).

Изследвано бе влиянието на включените в хидрофобния PCL блок цинамилови групи върху капацитета на натоварване на CBD в мицелните носители. Температурата на зол-гел прехода на HPC беше регулирана до близка до нормалната телесна температура чрез добавяне на K₂SO₄, така че формулировката да може да се инжектира под формата на течност и да се образува гел в човешкото тяло. Чрез динамично реологично измерване бяха определени модулите на еластичност и на загуби при различни концентрации на солта в температурният интервал 25 - 40° C. Разтворът на HPC в 0.15M K₂SO₄ показва оптимален фазов преход при температура от 34 °C до 37 °C, кратко време на гелообразуване и типични свойства на вискоеластичен гел при физиологична температура.



Фигура 1. Схематично представяне на получаване на инжекционен нанокомпозилен *in situ* хидрогел за доставяне на канабидиол.

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, ДО1-358/17.12.2020 и ДО1-278/03.12.2021.’

ИЗОЛИРАНЕ, РАЗДЕЛЯНЕ И ПРЕЧИСТВАНЕ НА ФИТОХИМИКАЛИ ОТ ПЛОДОВЕ НА *S.NIGRA* ЗА АНАЛИЗ НА БИОЛОГИЧНАТА ИМ АКТИВНОСТ

Александър Цинцаров¹, Мария Петрова¹, Александър Душков¹, Георги Стоев¹, Ива Угринова¹

¹ Институт по молекулярна биология "Акад. Румен Цанев", Българска академия на науките, ул. „Акад. ул. Г. Бончев, бл. 21, 1113 София, България
*E-mail: alexander_imb@abv.bg

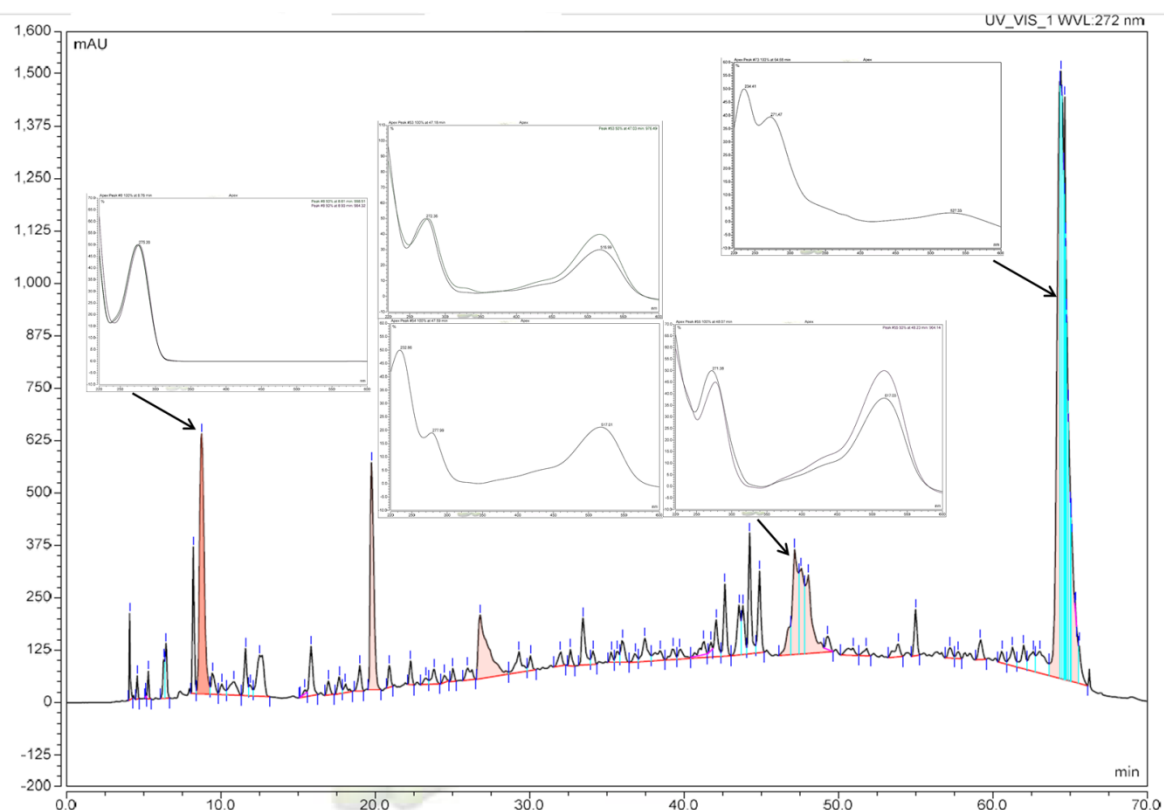
Ключови думи: *S.nigra*; фитохимикали; HPLC/DAD

Реактивните кислородни видове, генерирани чрез различни извънклетъчни и вътреклетъчни процеси, привлякоха вниманието на учените като нови сигнални молекули, участващи в биологични процеси като растеж, диференциация и клетъчна смърт. ROS възникват както в резултат на естествени метаболитни процеси на клетъчно ниво, така и в условия на клетъчен стрес, предизвикан от различни екзогенни фактори. Прекомерното образуване на ROS води до състояние, известно като оксидативен стрес. Антиоксидантите са съединения, които регулират нивата на ROS в клетките и предотвратяват част от техните химични взаимодействия. Много антиоксиданти са екзогенни за човешките клетки и присъстват в различни лечебни растения. Такова растение е черният бяз – *S.nigra*. Бъзът е богат на хранителни вещества, като въглехидрати, протеини, мазнини, мастни киселини, органични киселини, минерали, витамини и етерични масла. Бъзът също съдържа полифеноли, флавоноиди и антоциани, притежаващи антиоксидантна активност¹.

Представената работа онагледява пътя, по който се извършва изолирането и прецизното разделяне и охарактеризиране на съединенията, получени при приготвянето на водно-етанолен екстракт от плодовете на черния бяз. Целта на работата е да се оптимизират условията за екстракция, така че прецизно да се определи биологичната активност на групите съединения в тези плодове.

За да се изпълни целта на изследването бяха направени тинктури от плодове на *S.nigra* с 50% етанол. След отделяне на твърдите частици, тинктурите бяха изсушени на вакуум-изпарител и преразтворени в дейонизирана вода с 0,01% HCL. След очистване на екстрактите с етилацетат, те бяха натоварени на колона, съдържаща слабо полярна нейонна смола Amberlite XAD7. Тази смола разделя смесите от вещества, нанесени на нея, по полярност и молекулна маса. След адсорбиране на анализираната смес и промиване, бе извършено последователно елуиране с 35%, 70% и 90% етанол. Така бяха получени молекулни фракции с различна полярност, които след концентриране чрез сушене бяха анализирани спектрофотометрично и чрез HPLC/DAD анализ. За определяне на адекватни дози за третиране на клетъчни култури при прецизни изследвания на биологичната активност, бе извършен МТТ тест за цитотоксичност.

Резултатите ни показват богато съдържание на съединения от различните класове флавоноиди, като голяма част от тях са от подгрупата на антоцианите. Разделянето е извършено успешно и позволява още по-подробен анализ на състава с допълнителни стъпки на разделяне и използването на мас-спектрометрия за точно охарактеризиране на съединенията в екстрактите.



Фигура 1. Резултат от HPLC/DAD анализ на молекулна фракция от тинктура от *S. nigra*, получена след адсорбиране на колона с Amberlite XAD7 и елуиране с 35% етанол. На хроматограмата са добавени спектрите на абсорбция във видимия и UV спектър на пикове на съединения от клас флавоноиди.

Литература: ¹ Młynarczyk, K., Walkowiak-Tomczak, D., & Łysiak, G. P. (2018). Bioactive properties of *Sambucus nigra* L. as a functional ingredient for food and pharmaceutical industry. *Journal of functional foods*, 40, 377–390. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.11.025>

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, ДО1-358/17.12.2020 и ДО1-278/03.12.2021.



ПРОТЕИНОВ ПРОФИЛ НА КОРТЕКС ОТ ПЛЪХ ПРИ СКОПОЛАМИН – ИНДУЦИРАНА ДЕМЕНЦИЯ ОТ АЛЦХАЙМЕР ТИП С ПРИЛАГАНЕ НА СЛУЗ ОТ ОХЛЮВИ КАТО НЕВРОПРОТЕКТИВЕН АГЕНТ

В. Атанасов¹ *, Л. Велкова¹, М. Лазарова², Л. Танчева², Ал. Долашки¹, Р. Калфин², П. Долашка¹

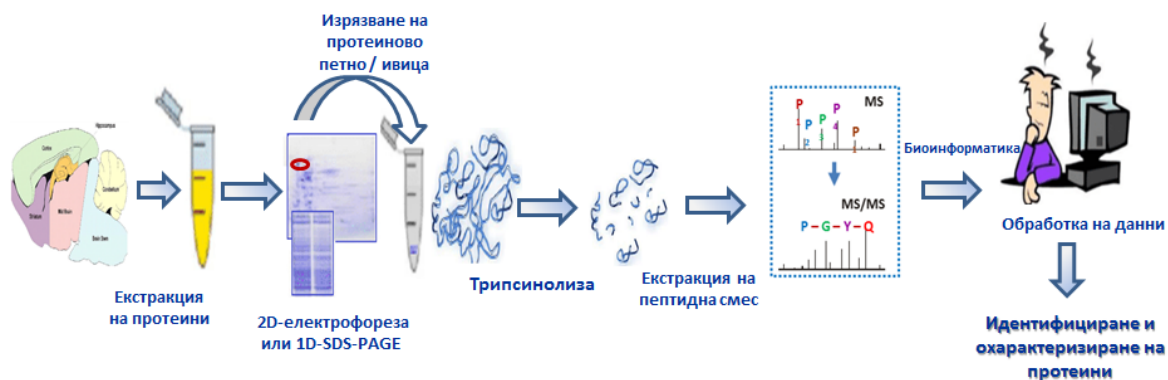
¹Институт по органична химия с Център по фитохимия,
Българска академия на науките, ул. Акад. Г. Бончев 9, 1113 София

²Институт по невробиология,
Българска академия на науките, ул. Акад. Г. Бончев 23, 1113 София

* E-mail: ventseslav.atanasov@orgchm.bas.bg

Ключови думи: Алцхаймер тип деменция, мозъчна кора, скополамин, екстракт от охлюви, протеинов профил

Болестта на Алцхаймер е най-честата причина за деменция - постепенно влошаване на паметта, поведението, мисленето и социалните умения, която постепенно прогресира с времето и завършва с летален изход. Скополаминът е често използван агент за индукция на деменция от Алцхаймер тип при опитни животни. Приложен е скополаминов модел за оценка на потенциалния невропротективен ефект на слюзта от градински охлюви *Helix aspersa* върху невродегенеративни процеси *in vivo*, на мъжки полове зрели опитни плъхове от порода Wistar. Изследвани са три групи: (а) контролна група от здрави плъхове, (б) скополаминова група (третирана със скополамин) и (в) експериментална група, третирани едновременно със скополамин и слюз от охлюви. Изследвани са промените в експресията на протеините в мозъчни хомогенати от кортекса на плъхове в скополаминовата група и в групата на животните, третирани едновременно със скополамин и екстракт от слюзта на охлюви *H. aspersa* чрез двумерационална полиакриламидна гел електрофореза (2Д ПААГЕ) и маспектрометрия (MALDI-TOF-MS и MALDI-TOF-MS/MS анализи). Протеините с променена експресия от мозъчната кора (кортекс) са идентифицирани чрез онлайн бази данни MASCOT Peptide Mass Fingerprint[®] и NCBI BLAST, софтуер IQTL[®] и Melanie[™] Coverage 9. Установихме, че екстрактът от слюзта на охлюви *H. aspersa* има протективна роля в кортекса на плъхове при експериментален модел на индуцирана от скополамин деменция от типа на Алцхаймер. Механизмът на това действие предстои да бъде изяснен.



Фигура 1. Основни стъпки на протеомния анализ: от биологична проба до идентифицирани протеини.

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, ДО1-358/17.12.2020 и ДО1-278/03.12.2021.

ПРЕДИМСТВО НА 3D РАКОВИ КЛЕТЪЧНИ МОДЕЛИ ПРИ ИЗСЛЕДВАНЕТО НА ЕМТ ПРЕХОД СЛЕД ТРЕТИРАНЕ С HMGB1

Д. Владимирова^{1*}, Й. Тодорова¹

¹*Институт по молекулярна биология, БАН, София, ул. Акад.Г.Бончев, бл. 21*

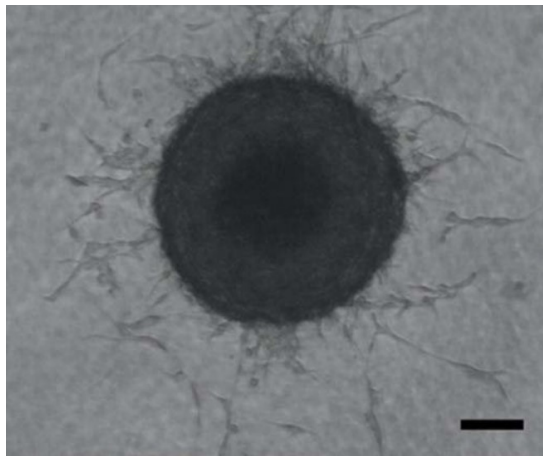
Ключови думи: 3D сфероиди, резистентност към терапия

Раковите клетки, подложени на епително-мезенхимален преход (ЕМТ), придобиват фенотип, подобен на стволовите клетки, свързан със злокачествено поведение, химиорезистентност и рецидив. Настоящите 2D *in vitro* културни модели на туморогенеза са недостатъчни, за да възпроизведат сложността на *in vivo* микросредата. Поради тази причина създаването на триизмерни (3D) конструкции е основна предпоставка за формиране на многоклетъчни туморни сфероиди за изучаване на основните патологични механизми.

Изследването се фокусира върху две неща: (i) проектиране и създаване на 3D сфероиди от ракови клетки чрез метилцелулоза, вградени в гел от колаген тип 1, и (ii) определяне на потенциалните роли на 3D сфероидите, свързани с ЕМТ, в прогресията на рака и метастазите.

Нашите констатации разкриха, че след третиране с HMGB 3D сфероидите засилват своята клетъчна пролиферация и инвазия, както е доказано от клетъчния модел, вграден в колагенов гел (Фигура 1), повишаването на регулацията на мезенхимни маркери като vimentin и понижаване на експресията на епителни маркери като E-cadherin.

Редица противотуморни вещества вече са тествани на 2D *in vitro* културни модели на туморогенеза и терапевтичните резултати са обещаващи. Следващата стъпка от изследването ни е да тестваме подобни вещества от естествен произход, например канабидиол, върху 3D ракови модели с цел определяне на терапевтична ефикасност, измерена чрез намаляване на инвазията и понижение в експресията на мезенхимните маркери.



Фигура 1. Фазово изображение на инвазията на раковите клетки. Разпространение на сфероид от ракови клетки, вграден в колагенов гел. Мащаб, 50 μ m. Сфероидът е изобразен с помощта на инвертиран двуфотонен микроскоп с 40 \times маслена обективна система.

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, ДО1-358/17.12.2020 и ДО1-278/03.12.2021.



АНТИТУМОРНА АКТИВНОСТ НА НОВОСИНТЕЗИРАНИ ДНК ИНТЕРКАЛИРАЩИ ХЕТЕРОЦИКЛЕНИ КОНДЕНЗИРАНИ НАФТАЛИМИДИ

Златина Влахова^{1*}, Моника Мутовска², Юлиан Загранярски², Ива Угринова¹

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

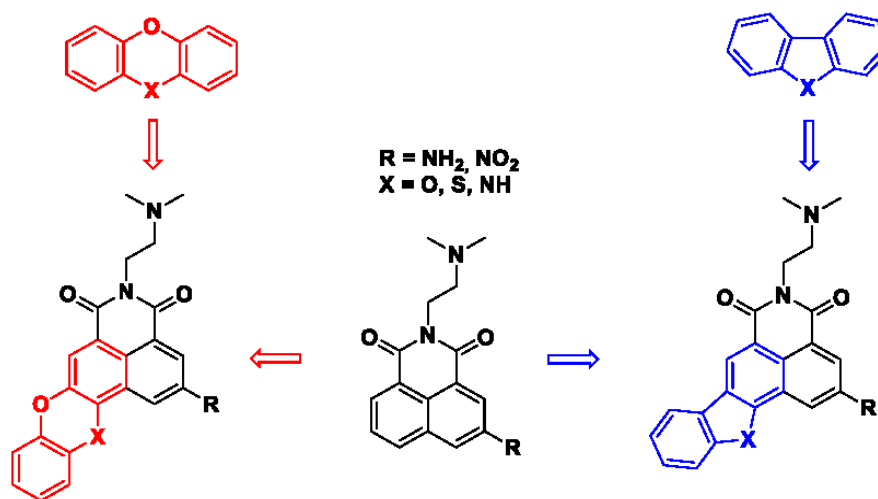
² *Факултет по химия и фармация, Софийски университет „Св. Климент Охридски“, бул.
Джеймс Баучър 1., 1164 София, България*

Ключови думи: нафталимиди, хетероцикли, интеркалация, антитуморно действие

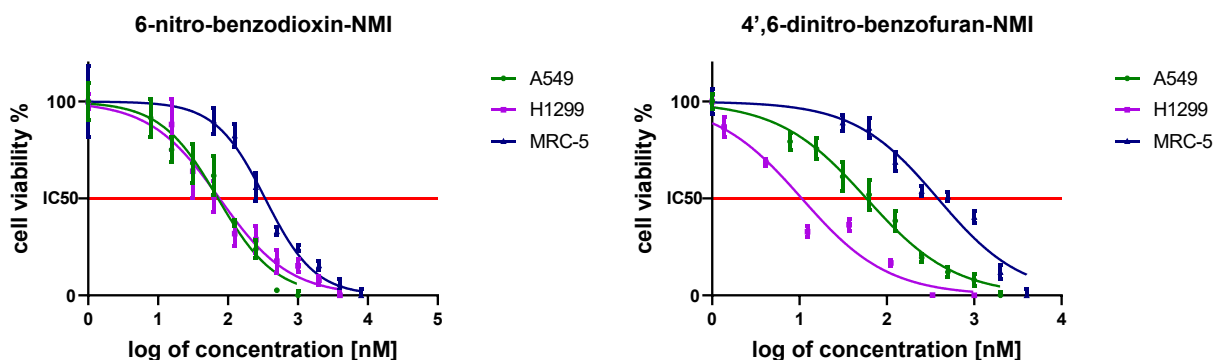
Напредъкът в биомедицината през последните две десетилетия доведе до значителна промяна в лечението на рака. Въпреки това настоящите лечения все още имат много ограничения, което кара изследователите да разработват нови агенти, насочвайки се към многоцелева, персонализирана химиотерапия с ниски странични ефекти. 1,8-нафталимидите са клас хетероцикли, характеризиращи се с π -дефицитна равнинна ароматна система, показваща широк спектър от биологични приложения във фармацевтичните продукти, включително аналгетични, антибактериални, антивирусни и противоракови ефекти. Склонността на нафталимидите да се интеркалират в базови двойки на ДНК чрез свързване с ДНК-бразда и инхибиране на топоизомераза е това, което до голяма степен им придава забележителни антипролиферативни ефекти.

Целта на това изследване е да се оцени цитотоксичната активност на концептуално нови съединения на базата на 1,8-нафталимиди. Използвахме човешки ракови клетъчни линии, с различен профил и степен на експресия на онкогени и/или гени за лекарствена резистентност, както и неракови клетъчни линии. Полу-максималната инхибиторна концентрация (IC₅₀) на веществата е получена от експериментално получена крива.

Няколко от нашите новосинтезирани съединения показаха впечатляваща антитуморна активност и бяха по-активни от класически добре проучени нафталимиди. Впечатляващ и обещаващ е и изчисленият индекс на селективност, съотношението на токсичната концентрация на съединенията към ефективната им биоактивна концентрация.



Фигура 1. Концепция за проектиране на целеви структури.



Фигура 2. Експериментално получени криви на A549, H1299 и MRC-5 клетки, третираны с 6-нитро-бензодиоксин-1,8-нафталимид и 4',6-динитро-бензофуран-1,8-нафталимид.

Благодарности: Това изследване е финансирано от Фонд „Научни изследвания“ по договор КП-06-Н61/1 от 13.12.22 г.

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, ДО1-358/17.12.2020 и ДО1-278/03.12.2021.



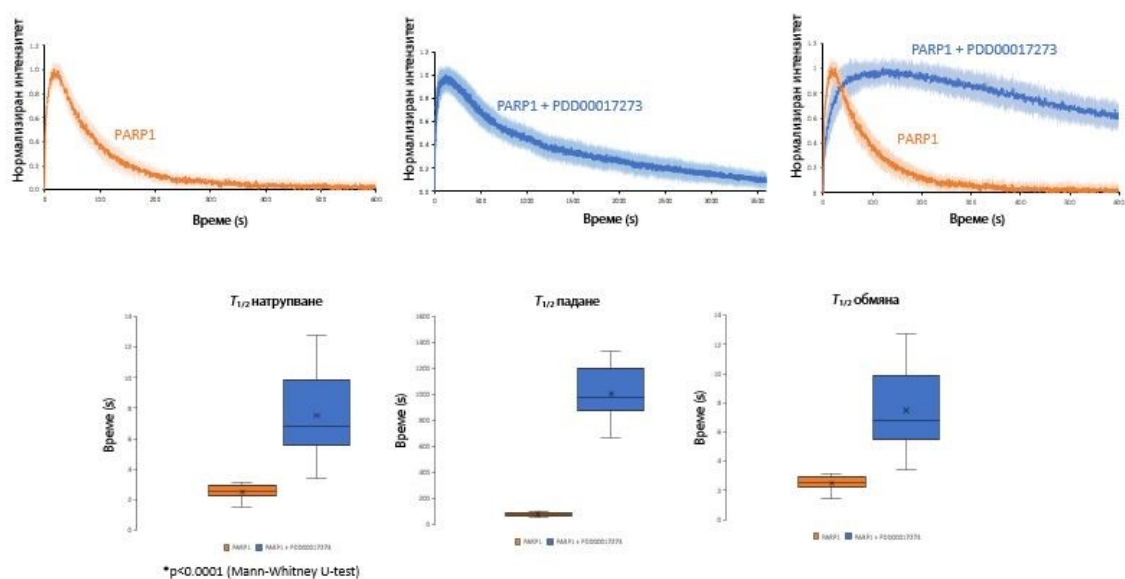
ЕФЕКТ НА НЕОГРАНИЧЕНОТО ПАРИЛИРАНЕ ВЪРХУ ДИНАМИКАТА НА PARP1 В КОМПЛЕКСНИ ДНК УВРЕЖДЕНИЯ

Петър-Богомил Кънев¹, Радослав Александров¹, Стойно Стойнов¹

¹ *Институт по молекулярна биология „Академик Румен Цанев“ – Българска академия на науките, ул. „Акад. Георги Бончев“ бл. 21*

Ключови думи:

Като основен сензор за едно- и двуверижни скъсвания, PARP1 бързо открива такива повреди и фасилитира привличането на фактори за поправката на ДНК и ремоделиране на хроматина около повредата. Това се постига чрез PARP1-медирано поли(АДФ)-рибозилиране (ПАРилиране) на самия PARP1 ензим (автоПАРилиация), на хистони и други мишени. Масивно ПАРилиране около повредата декомпактира хроматина и привлича различни ПАР-свързващи фактори. Тази модификация се случва бързо и е обект на стриктна регулация под влиянието на "пишещи", "изтриващи" и "четящи" ензими. Навременното отстраняване на ПАР полимери от хидролази като PARG и ARH3 е от съществено значение за оптималното протичане на последващи събития в ДНК поправката. В настоящия труд изследвахме ефектите на инхибирането на PARG при места на комплексни ДНК увреждания, предизвикани от микро-ирradiация, с конкретен фокус върху натрупването и дисоциацията на PARP1, както и върху динамиката на архетипните ПАР-свързващи фактори XRCC1 и ARH3. Интересното е, че наблюдавахме повишено задържане на PARP1 на местата на увреждане при условия на неограничено ПАРилиране. Подобни промени бяха забелязани и при динамиката на ПАР-свързващите фактори XRCC1 и ARH3. Наблюдаваното задържане на PARP1 ни подтикна да оценим обмена на PARP1 молекули чрез fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). Инхибирането на PARG индуцира значително задържане на PARP1 на места на комплексни ДНК повреди. Настоящите открития оспорват широко приетия модел, който гласи, че освобождаването на PARP1 от ДНК скъсвания зависи от неговото автоПАРилиране.



Фигура 1. Натрупване, падане и обмяна на PARP1 при места на комплексни ДНК увреждания при инхибиране на PARP чрез PDD00017273.

Благодарности: Изказваме 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.



ВЛАКНЕСТИ МАТЕРИАЛИ ОТ ШИФОВА БАЗА НА ХИТОЗАНА И ПОЛИЛАКТИД С АНТИБАКТЕРИАЛНА И ПРОТИВОРАКОВА АКТИВНОСТ

Ина Анастасова¹, Милена Игнатова¹, Невена Манолова¹, Илия Рашков¹, Надя Маркова², Ани Георгиева³ и Ренета Тошкова³

¹Лаборатория Биологично активни полимери, Институт по полимери, Българска академия на науките, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 103, вх. А, София

²Институт по микробиология, Българска академия на науките, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 26, София

³Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей, Българска академия на науките, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 25, София

Ключови думи: Шифова база; хитозан; електроовлажняване; полилактид; 8-хидроксихинолин-2-карбоксалдехид; антибактериална активност; противоракова активност

Електроовлажняването е привлекателна и евтина техника за получаване на влакнести полимерни материали (т. нар. матове или нетъкан текстил) с уникални свойства, като висока специфична повърхност, порьозност и лекота. Хитозанът (Ch), като природен полимер е биосъвместим и биоразградим, и притежава редица ценни биологични свойства (антибактериални, антиоксидантни и противоракови). Известно е, че производните на 8-хидроксихинолина също притежават редица ценни биологични свойства. Следователно, получаването на влакнести материали от Шифовата база (Ch-8Q) на Ch с 8-хидроксихинолин-2-карбоксалдехида представлява интерес от гледна точка на тяхното потенциално биомедицинско приложение.

В настоящото изследване чрез електроовлажняване успешно са получени влакнести материали от Ch-8Q в присъствие на алифатния и биоразградим полиестер – поли(L-лактид-съ-D,L-лактид) (PLDLA)¹. Морфологията и химическият състав на повърхността на матовете от PLDLA/Ch-8Q са анализирани съответно със сканираща електронна микроскопия, инфрачервена и рентгенова-фотоелектронна спектроскопия. Проведените микробиологични изследвания показаха, че матовете съдържащи Ch-8Q имат изразено бактерицидно действие и висока ефективност на потискане на адхезията на *S. aureus*. В допълнение, тези матове показват добра противоракова активност спрямо човешки HeLa и MCF-7 клетки. Следователно, получените влакнести материали са обещаващи за превръзки за рани и за локално приложение при лечение на рак на шийката на матката и рак на гърдата.

Литература: ¹M. Ignatova et al., *Polymers*, **2022**, 14, 5002.

Благодарности: На проект BG05M2OP001-1.002-0012-C01 „Устойчиво оползотворяване на био-ресурси и отпадъци от лечебни и ароматични растения за иновативни биоактивни продукти“, финансиран от ОП-НОИР, съфинансирана от ЕС чрез ЕСИФ и на Договор КП-06-Н39/13 от 2019 г., финансиран от ФНИ.

ЕФЕКТ НА КАНАБИДИОЛ (CBD) ВЪРХУ ПРОЛИФЕРАЦИЯТА, КЛЕТЪЧНИЯТ ЦИКЪЛ И МЕТАСТАТИЧНИЯТ ПОТЕНЦИАЛ НА IN VITRO МОДЕЛ НА РАК НА БЯЛ ДРОБ

Л. Лазаров¹*, Ш. Мяшкова¹, Й. Тодорова¹, М. Петрова¹, И. Угринова¹

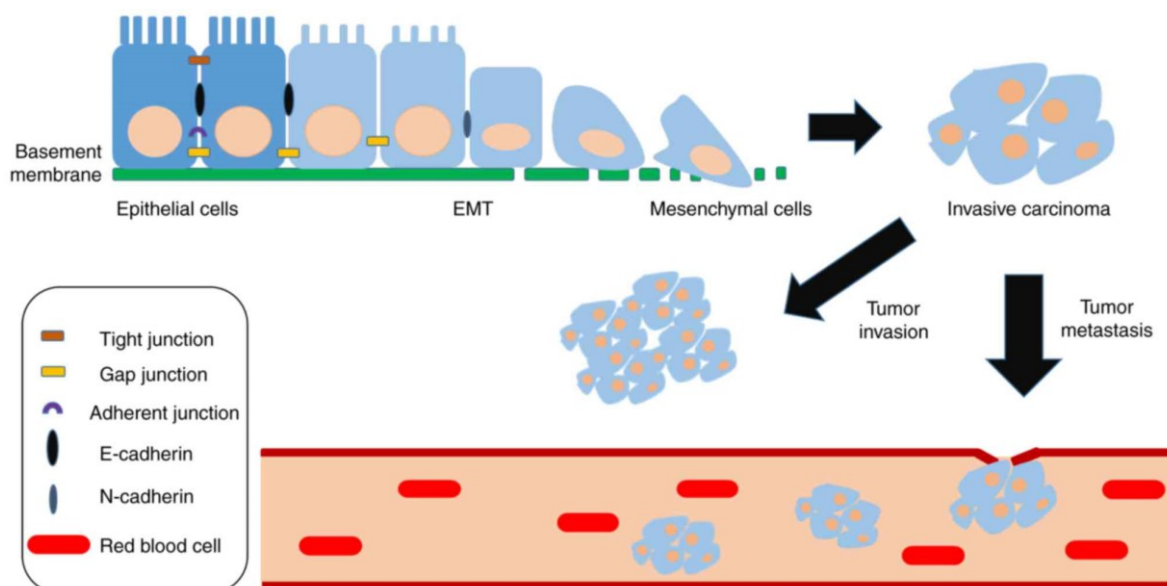
¹Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“, Българска академия на науките, ул. Ак. Г. Бончев, бл. 21 София 1113

Канабидиолът (CBD) е фитоканабиноид, открит през 1940 г. Клиничните изследвания на CBD включват проучвания за ефекта му при третиране на различни психопатологични и патологични състояния. През последните години основният фокус на проучванията върху CBD е върху неговата силна антитуморна активност.

Ето защо решихме да тестваме как канабидиолът ще повлияе на раковите клетки *in vitro*, като използваме модел белодробни ракови клетки (клетъчни линии A549, H1299). Ние оценихме ефекта му върху клетъчната пролиферация и дали той причинява ДНК увреждания чрез EdU/ γ H2AX анализ. Също така изследвахме влиянието на CBD върху клетъчния цикъл, използвайки FACS анализ. Освен тези анализи изследвахме дали има промяна в EMT (epithelial-mesenchymal transition) маркери при тези ракови линии с помощта на Western blot и имунофлуоресцентен анализ.

Получените от нас данни показаха, че този фитоканабиноид инхибира пролиферацията и при 2те ракови клетъчни линии вероятно заради двойноверижните повреди в ДНК предизвикани от третирането. За да проверим дали това не се дължи на блокиране на клетъчния цикъл ние използвахме FACS анализ. Резултатите от този анализ показаха задържане в G1 контролната точка на клетъчния цикъл. Следващата ни задача беше да установим дали канабидиола влияе върху метастатичния потенциал на раковите линии. Използваните от нас Western blot анализ и имунофлуоресцентен анализ показаха спад в експресията на виментин и N-cadherin. Освен това наблюдавахме транслокация на β -катенин. За позитивна контрола, стимулираща клетъчното движение, ние използвахме рекомбинантен HMGB1 белтък.

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, ДО1-358/17.12.2020 и ДО1-278/03.12.2021.



Фигура 1. Обща характеристика на ЕМТ. Преходът на епителните клетки към мезенхимален фенотип, индуциран от туморната среда или определени вариации, се проявява главно в загуба на клетъчна полярност, както и плътни връзки и адхезионни връзки, което води до генериране на мезенхимни клетки от епителни клетки и повишен миграционен и инвазивен капацитет. Загубата на Е-кадхерин е предизвикана от повишена експресия на мезенхимни маркери.



ПРОТИВОТУМОРНО И ИМУНОМОДУЛИРАЩО ДЕЙСТВИЕ НА ХЕМОЦИАНИНИ ОТ *HELIX LUCORUM*, *HELIX ASPERSA* И *RAPANA VENOSA* ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА АСЦИТЕН КАРЦИНОМ НА ЕРЛИХ

Инна Суликовска^{1*}, Ани Георгиева¹, Катерина Тодорова¹, Валерия Дилчева¹, Ивелин Владов¹, Ренета Тошкова¹, Светлозара Петкова¹, Людмила Велкова², Павлина Долашка², Иван Илиев¹

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

²Институт по органична химия с Център по фитохимия, Българска академия на науките, София 1113, България

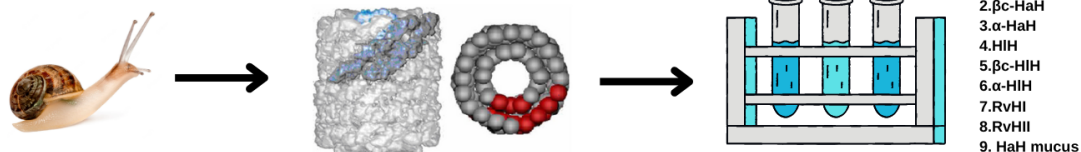
* e-mail: inna_sulikovska@ukr.net

Ключови думи: хемоцианини, асцитен карцином на Ерлих, антитуморна активност, имуностимулираща активност

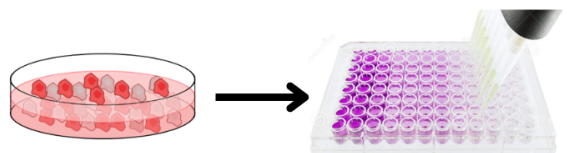
Хемоцианините са гликопротеини, пренасящи кислород в хемолимфата на някои видове безгръбначни, които привличат научния интерес като потенциални противоракови терапевтични средства. Целта на настоящото изследване е да се проучи *in vitro* и *in vivo* антитуморната активност на хемоцианини, изолирани от *Helix aspersa*, *Helix lucorum* и *Rapana venosa* при модел на асцитен карцином на Ерлих. *In vitro* антипролиферативната активност на хемоцианините е оценена чрез Neutral Red Uptake Assay. Морфологичните промени, предизвикани от хемоцианините в туморните клетки са изследвани чрез флуоресцентна микроскопия след оцветяване с АО/PI и DAPI. *In vivo* ефектите на хемоцианините са изследвани при миши модел на рак на гърдата, след тройна имунизация с препарати, съдържащи хемоцианини. Оценена е преживяемостта на експерименталните животни. Чрез ELISA-анализ са определени серумните титри на антитела срещу изследваните хемоцианини и срещу туморния антиген при контролните и опитните животни. Морфологична оценка на токсичността, отговора на имунната система и антитуморния ефект е извършена чрез хистопатологичен анализ. Резултатите от *in vitro* проучванията показват, че тестваните проби от хемоцианини предизвикват значителна антипролиферативна активност. Изследванията *in vivo* демонстрират защитен антитуморен ефект, изразяващ се в удължено време на оцеляване на експерименталните животни. При хистопатологичния анализ не са открити патохистологични признаци на токсично увреждане в паренхимните органи. Проведените биологични, хистологични и серологични изследвания разкриват изследваните хемоцианини като обещаващи кандидати за противотуморна терапия при рак на гърдата.

Фигура 1. *In vitro* и *in vivo* антитуморна активност на хемоцианини от гастроподни организми

ИЗОЛИРАНЕ НА ХЕМОЦИАНИНИ



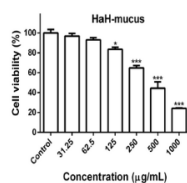
IN VITRO ИЗСЛЕДВАНИЯ



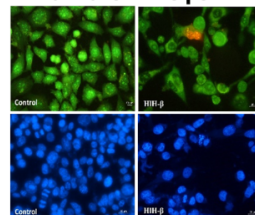
ЕАС клетъчна линия

Антитуморна активност

Антитуморен ефект



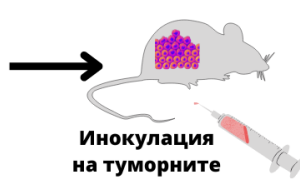
Апoptогенни ефекти



IN VIVO ИЗСЛЕДВАНИЯ

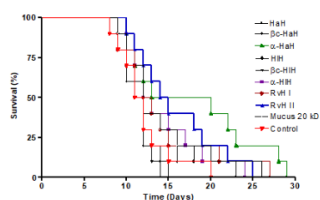


Имунизация
с хемоцианини

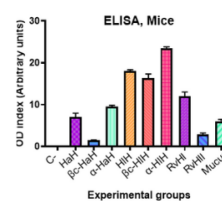


Инокулация
на туморните
клетки

Противотуморно действие



Имуномодулиращо 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, ДО1-358/17.12.2020 и ДО1-278/03.12.2021.



СЕГМЕНТАЦИЯ И ПРОСЛЕДЯВАНЕ НА ХРОМОЗОМИ ЧРЕЗ МАШИННО ОБУЧЕНИЕ

Румен Стаматов¹, Мария Карабоева¹, Тавиан Благоев¹, Соня Узунова¹, Силвия
Върхошкова¹, Диляна Кирова¹ и Стойно Стойнов¹

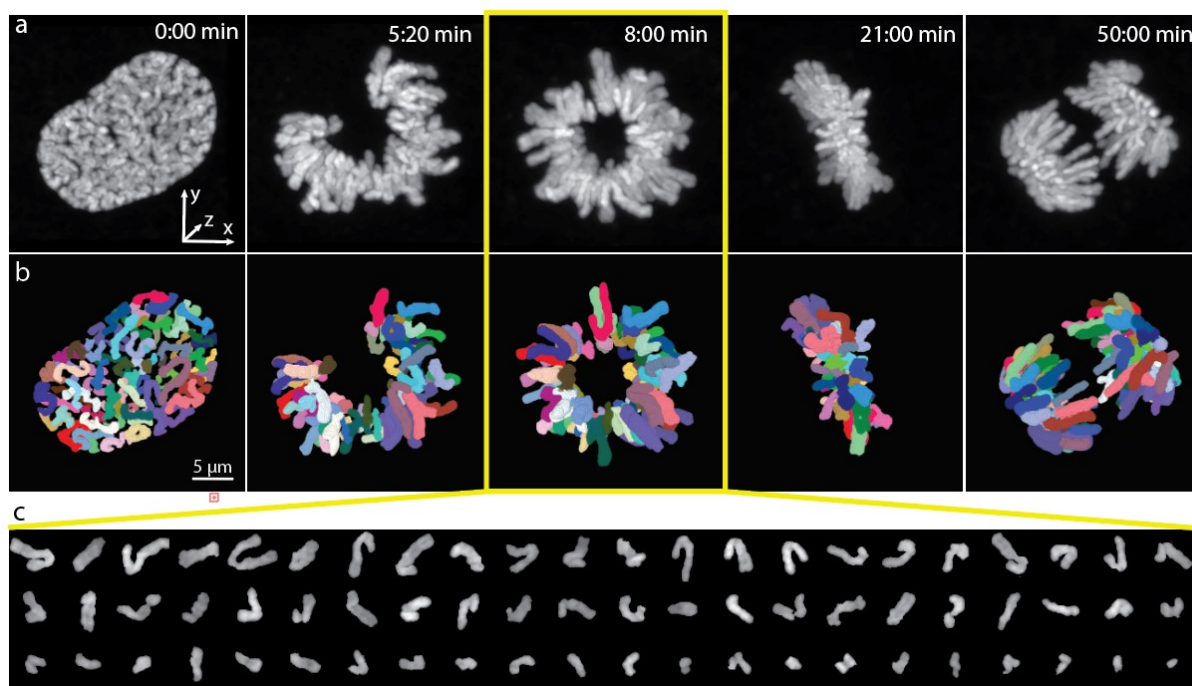
¹*Институт по молекулярна биология “Акад. Румен Цанев”,
Българска академия на науките*

Ул. Георги Бончев 21, София 1010

Кондензацията на хроматина по време на митоза позволява визуализирането на отделните хромозоми чрез светлинна и флуоресцентна микроскопия. Въпреки че съществуват множество методи за проследяване на хромозоми във фиксирани проби, сегментирането и проследяването на хромозоми в живи клетки си остава предизвикателство по две причини. Първо, изображенията с висока разделителна способност водят до фототоксичност, което прави невъзможно следенето на живи клетки в митоза. Второ, липсват 3D алгоритми за сегментиране и проследяване на хромозоми.

За да улесним сегментацията, първо обучихме невронна мрежа, която подобрява качеството на изображенията (увеличава съотношението сигнал-шум). След това сегментирахме ръчно хромозомите в 300 различни изображения. Използвайки тези сегментации, обучихме втора невронна мрежа, която извършва сегментацията автоматично. Комбинирайки отделните сегментации с еластична регистрация ни позволи да проследим хромозомите през цялата митоза (Фиг. 1). Използвайки този метод, определихме кариотипа на 3 различни клетъчни линии и проследихме хромозомите на единична Hela-Kyoto клетка в продължение на 72 часа през 4 поколения.

Очакваме разработеният метод да намери приложение в медицината при определяне на хромозомния набор на туморни клетки, което би помогнало за по-ясно разбиране на вида и произхода на съответния тумор, както и като мощен инструмент за изучаване на организацията на хроматина по време на митоза.



Фиг. 1 Сегментация и проследяване на хромозоми по време на митоза.

(а) Максимална проекция на RFP сигнала. (b) Сегментация на съответните сурови изображения. (c) Изолиране на отделните хромозоми.

Благодарности: Авторите изказват своята благодарност на договор КР06-Н21-9/18.12.18 и Euro-Bioimaging

**СПИСЪК С КОНТАКТИ**

Участник	Месторабота	Контакти	Стр.
Александър Долашки	Институт по органична химия с център по фитохимия, БАН	adolashki@yahoo.com	12
Александър Цинцаров	Институт по молекулярна биология, БАН	alexander_imb@abv.bg	42
Венцеслав Атанасов	Институт по органична химия с Център по фитохимия	ventseslav.atanasov@gmail.com	44
Галина Радева	Институт по молекулярна биология, БАН	galrad@abv.bg	15
Геновева Начева	Институт по молекулярна биология, БАН	genoveva@bio21.bas.bg	28
Десислава Владимирова	Институт по молекулярна биология, БАН	desivladimirova@abv.bg	46
Деница Момекова	Фармацевтичен ф-т, МУ София	dmomekova@yahoo.com	9
Евдокия Пашева	Институт по молекулярна биология, БАН	eva@obzor.bio21.bas.bg	1
Елена Кръчмарова	Институт по молекулярна биология, БАН	elenakrachmarova@bio21.bas.bg	28
Елена Лилкова	Институт по информационни и комуникационни технологии, БАН	helen_lilkova@yahoo.com	13
Златина Влахова	Институт по молекулярна биология, БАН	vlahova94@gmail.com	48
Ива Угринова	Институт по молекулярна биология, БАН	ugryiva@gmail.com	7, 9
Иван Илиев	Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей	taparsky@abv.bg	16
Инна Суликовска	Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей	inna_sulikovska@ukr.net	38, 55
Ина Анастасова	Институт по полимери, БАН	ina30@abv.bg	52
Йордана Тодорова	Институт по молекулярна биология, БАН	jordanabg@yahoo.com	19
Катя Каменова	Институт по полимери, БАН	<u>kkamenova@polymer.bas.bg</u>	40



Лазар Лазаров	Институт по молекулярна биология, БАН	lazarutko@gmail.com	53
Леандър Литов	Софийски университет	Leandar.Litov@cern.ch	21
Мария Петрова	Институт по молекулярна биология, БАН	mhristova84@abv.bg	42
Невена Илиева	Институт по информационни и комуникационни технологии, БАН	nevena.ilieva@iict.bas.bg	23
Николай Василев	Институт по органична химия с Център по фитохимия	niki@orgchm.bas.bg	25
Оля Стоилова	Институт по полимери, БАН	olya.stoilova@cu.bas.bg	27
Павлина Долашка	Институт по органична химия с Център по фитохимия	pda54@abv.bg	11
Петър Кънев	Институт по молекулярна биология, БАН	petarb.kanev@gmail.com	50
Радина Николова	Институт по молекулярна биология, БАН	radina.nikolov@gmail.com	34
Пейчо Петков	Институт по информационни и комуникационни технологии, БАН	peicho.petkov@gmail.com	28
Румен Стаматов	Институт по молекулярна биология, БАН	rstamatov@gmail.com	57
Светослава Петкова	Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей	svetlozarapetkova@abv.bg	18
Соня Станева	Институт по молекулярна биология, БАН	sonyaonherown@gmail.com	36
Спиро Константинов	Фармацевтичен ф-т, МУ София	Konstantinov.spiromihaylov@gmail.com	30
Шазие Юсеин-Мяшкова	Институт по молекулярна биология, БАН	shazi@abv.bg	32