

Доц. д-р Румяна Бакалова

АВТОРСКА СПРАВКА ЗА ПРИНОСНИЯ ХАРАКТЕР НА ТРУДОВЕТЕ

На конкурса за "професор" за щатно осигурена длъжност по научната специалност 4.3. Биологически науки (биофизика) в Медицински факултет към Софийски университет "Св. Климент Охридски", д-р Румяна Атанасова Бакалова-Желева се представя със следните научни трудове:

- монография със заглавие „Нанотехнологии за биомедицинска диагностика: част 1, Квантови точки”, Университетско издателство „Св. Климент Охридски”, София, 2011;
- автореферат на дисертация за присъждане на образователната и научна степен „доктор”;
- автореферат на дисертация за присъждане на научната степен „доктор на науките”;
- 105 научни статии в пълен текст (8 от които са части от книги и монографии) и 8 резюмета в списания с импакт фактор; 91 от статиите са публикувани в чужди научни издания и 14 – в български научни издания;
- 4 патента (3 японски и 1 български);
- 77 резюмета от участия в научни конференции, публикувани в сборници;
- 2 учебни помагала и 3 учебни програми по биофизика;
- 11 финансирани научни проекта (на 7 от които Р. Бакалова е ръководител) - 4 от проектите са финансирани от български фондове за научни изследвания и 7 – от чужди фондове (японски и американски).

Научните приноси, описани по-долу, са разпределени в следните раздели:

1. Биомембрани
2. Свободно-радикални процеси:
 - а) регулация;
 - б) роля в патогенезата;
 - в) роля в биомедицинската диагностика;
 - г) методи за анализ.
3. Биофотоника:
 - а) флуоресцентен резонансен енергетичен пренос;
 - б) двуфотон-възбудена флуоресценция;
 - в) мултимодален имиджинг;
 - г) биосензори;
 - д) лазер-Доплерова флоуметрия (методични аспекти);
 - е) микроарей анализ (методични аспекти);
 - ж) електрофореза (методични аспекти).
4. Рецепторни взаимодействия

5. Микроциркуляция и нервна активност
6. Трансфекции
7. Клетъчна сигнализация и апоптоза
8. Антисенс технологии и РНК интерференция

Забележка: Приносите са описани на 17 страници.

I. ПРИНОСИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНАТА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР”

ТЕМА: "Структурни аспекти на антиоксидантното действие на витамин Е в мембраните".

(Статии във връзка с дисертационния труд - № 1, 10, 13, 15, 16, 21, 112)

ОСНОВНИ НАУЧНИ НАПРАВЛЕНИЯ: **БИОМЕМБРАНИ, АНТИОКСИДАНТИ, СВОБОДНО-РАДИКАЛНИ ПРОЦЕСИ**

ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР:

1. Показано е, че в хетерогенни системи на свободно-радикално окисление на липидите (каквито са мембранните суспензии), антиоксидантното действие на алфа-токоферола (чиято въглеродна верига е изградена от 16 въглеродни атома - C16) и неговите структурни хомолози (6-хидроксихроманите C1, C3, C6 и C11, чиято въглеродна верига е изградена съответно от 1, 3, 6 или 11 въглеродни атома) зависи от дължината на въглеродната верига във 2-ра позиция на хромановото ядро, за разлика от хомогенните системи на окисление, за които е известно, че ефективността на антиоксидантно действие на 6-хидроксихроманите (C1, C3, C6, C11 и C16) е приблизително една и съща.

2. За първи път са формулирани и публикувани причините за наблюдаваните различия в ефективността на антиоксидантното действие на алфа-токоферола и неговите структурни хомолози в мембранните структури:

(а) Различна ефективност на взаимодействие на 6-хидроксихроманите с липидните и водоразтворимите активни форми на кислорода. Показано е, че ефективността на взаимодействие с водоразтворимите активни форми на кислорода намалява в реда C1>C3>C6>C11. Алфа-токоферолът (C16), в концентрации до 1 mM, не взаимодейства с водоразтворимите активни форми на кислорода.

(б) Различна степен на кластеризация на 6-хидроксихроманите в мембраните, нарастваща с удължаване на въглеродната верига (C1>C3>C6>C11>C16).

(в) Различна транс-бислойна подвижност (флип-флоп) на 6-хидроксихроманите в мембраните, нарастваща със съкращаване на въглеродната верига (C1>C16).

ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР:

3. Потвърден е известния в литературата факт, че за проява на антиоксидантен ефект от страна на алфа-токофероловите естери е необходима деестерификация на фенолната хидроксилна група в молекулата.

4. Потвърден е фактът, че наличието на въглеродородна верига в молекулата на алфа-токоферола обезпечава съхраняването на антиоксидантния ефект на веществото по-дълго време, в сравнение с това на късоверижните 6-хидроксихромани С1 и С6, при прилагането им ин виво на експериментални животни.

5. Потвърдена е ролята на алфа-токоферола в инхибирането на липоксигеназните реакции при използване на два типа субстрат – в мицеларна форма и включен в състава на липозоми. Проведено е систематично изследване на механизмите на инхибиране на липоксигеназната реакция от алфа-токоферола, като за целта са използвани негови структурни аналози с различна дължина на въглеродородната верига и различна степен на хидрофобност (6-хидроксихроманите С1, С6, С11). Показано е, че константата на инхибиране нараства с нарастване дължината на въглеродородната верига на 6-хидроксихроманите, което е индикация за по-високия инхибиторен ефект на късоверижните аналози, в сравнение с този на алфа-токоферола. Установено е също, че инхибиторният ефект на 6-хидроксихроманите върху липоксигеназното окисление на мастните киселини е по-силно изразен при използване на мицеларен субстрат, в сравнение с използването на субстрат, включен в състава на липозоми.

Установените факти са с потенциално клинично значение, тъй като продуктите от липоксигеназното окисление на липидите (левкотриените) са в основата на развитието на алергиите. В тази връзка, алфа-токоферолът и неговите структурни аналози биха могли да бъдат потенциални кандидати в профилактиката и лечението на алергичните заболявания.

ПРИНОСИ С НАУЧНО-ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР:

6. Разработен е спектрофлуориметричен метод за регистриране кинетиката и определяне степента на хидролиза на естерни форми на алфа-токоферола в биологични обекти (микрозомални мембрани, митохондриални мембрани и кръвна плазма). Методът е защитен с патент за изобретение и през 1987 е внедрен в Института по Физиология на БАН.

7. Разработен е метод за определяне на степента на свързване и кластеризация на 6-хидроксихроманите в биологични мембрани и липозоми.

II. ПРИНОСИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА НАУЧНАТА СТЕПЕН „ДОКТОР НА НАУКИТЕ” (ДИСЕРТАЦИЯТА Е В ПРОЦЕДУРА НА ЗАЩИТА)

ТЕМА: "Разработване на мултифункционални бионанопроби на основата на квантови точки: структура, физикохимични характеристики и приложение за флуоресцентни имиджинг анализи и фотосенсибилизация".

(Статии във връзка с дисертационния труд – № 9, 55, 56, 62-70, 72, 77, 99, 101, 102, 105, 107, 117, 119-122, 128, 130; патенти – № 3-6, 9-12)

ОСНОВНИ НАУЧНИ НАПРАВЛЕНИЯ: НАНОТЕХНОЛОГИИ ЗА БИОМЕДИЦИНСКА ДИАГНОСТИКА, КВАНТОВИ ТОЧКИ, ФЛУОРЕСЦЕНТЕН ИМИДЖИНГ, МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНА ТОМОГРАФИЯ, ФОТОДИНАМИЧНИ ПРОЦЕСИ

ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР:

1. За първи път са описани QD CdSe, получени при нуклеиране и растеж на „стайна температура”, характеризиращи се с малък хомогенен размер (~2 nm в диаметър), широк спектър на „deep-trap” флуоресцентна емисия и висок квантов добив (~50%) във физиологични разтвори. Наночастиците са подходящи за разработване на таргет-специфични флуоресцентни проби за имиджинг анализи и фотосенсибилизация. Методът е защитен с патент.

2. Разработен е оригинален метод за едновременното получаване на минимум шест хомогенни по размер QD-фракции CdSe в бавнонарастващ температурен градиент. Методът позволява да се избегне Оствалдовия растеж на нанокристалите и да се получат QD-фракции с фокусиран размер и флуоресцентната емисия и сравнително висок квантов добив в органичен разтворител (35-60%). Методът е защитен с патент.

След опаковане на кристалните ядра CdSe с няколко монослоя ZnS и капсулирането им в биопоносими органични обвивки (дендримери или силика-шел), наночастиците са подходящи за разработване на таргет-специфични флуоресцентни проби за мултиплексни имиджинг анализи.

3. Разработена е оригинална стратегия за получаване на високофлуоресцентни водоразтворими QD CdSe/ZnS, капсулирани в силика-шел. Наночастиците са изградени от една QD в една силика-сфера и се характеризират със сравнително малък размер (~20 nm в диаметър) и висок квантов добив във водна среда (30-40%). На тяхна база е разработена оригинална мултимодална QD-проба, комбинираща флуоресцентни и парамагнитни контрастни свойства. Методът е защитен с патент.

4. За първи път е разработена флуоресцентна проба на базата на конюгиране на QD с растителни лектини и е показано, че пробата е подходяща за идентифициране на високодиференцирани левкемични лимфоцити от нормални лимфоцити с флуоресцентна конфокална микроскопия и флоуцитометрия.

5. За първи път са разработени нанохибриди QD-протеин (QD-лектин и QD-антитяло), изградени на принципа – една протеинова молекула, свързана химично с няколко малки по размер QD (~2 nm в диаметър). Описаните дотогава в литературата QD-протеинови нанохибриди са изградени на принципа – една голяма QD (над 10 nm в диаметър), конюгирана с няколко биомакромолекули.

6. Паралелно и независимо от други авторски колективи, QD-проби са приложени за флоуцитометричен анализ на антигени, разположени на повърхността на живи клетки, както и за флоуцитометричен анализ на вътреклетъчни антигени във фиксирани клетки, като за първи път

QD-проби не показват артефакти във флуориметричните изследвания на клетки.

7. Едновременно и независимо от други авторски колективи са разработени два високочувствителни QD-базирани имуноблот анализи на протеини (с флуоресцентна детекция). Единият от анализите позволява детекция на протеини, намиращи се в много ниски количества в клетъчния лизат, без предварителната им преципитация и концентриране. Методът е защитен с патент.

8. Разработена е оригинална „хибридизационна проба“ за FRET-анализ, изградена от QD, конюгирани с олигонуклеотид чрез 39-атомен спейсър. На базата на тази проба е разработен оригинален метод за селекция на антисенс-siRNA секвенции с висок афинитет към таргетната сенс-mRNA, базиращ се на FRET между QD-белязани siRNA секвенции и Cy5-белязана mRNA секвенция, при хибридизация на комплементарните участъци.

9. Едновременно и независимо от други колективи мултимодална QD-проба е приложена за неинвазивно визуализиране на тумори в експериментални животни *in vivo* с флуоресцентен имиджинг и MRI. Показана е възможността за визуализиране на туморите в ранен стадий на тяхното развитие.

10. За първи път в света е показано, че неупаковани водоразтворими QD могат да се използват за фотосенсибилизация на клетки към светлинно облъчване. Разработена е оригинална QD-проба и метод за фотосенсибилизация на ракови клетки. Пробата и методът са защитени с патент.

ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР:

11. Потвърдено е, че свободните кадмиеви и селениеви прекурсори в непречистени QD CdSe са основен фактор за пасивиране на повърхността на кристалните ядра при „стареене“ в органичен разтворител и модифициране на техните спектрални характеристики – повишаване на интензитета на флуоресценция, растеж на кристалите и фокусиране на размера

12. Потвърдено е, че времето на полуживот на флуоресценцията на клетки, маркирани с QD-белязани протеини, е значително по-дълго от това на клетки, маркирани с протеини, белязани с органичен флуорофор (FITC и Alexa). Това позволява продължително облъчване и скениране на QD-маркираните биологични обекти с ултравиолетова, видима и инфрачервена светлина, което улеснява тяхното локализиране и анализиране с флуоресцентна микроскопия.

13. Потвърдено е, че биоорганичната обвивка на QD определя стабилността и разтворимостта на наночастиците във високосолеви разтвори (какви са физиологичните течности), тяхната биопоносимост и цитотоксичност и е от изключително значение за прилагането им в *in vivo* имиджинг анализи. Показано е, че неомрежената катионна дендримерна обвивка на QD води до висока цитотоксичност (респ. ниска биопоносимост) на QD-пробата и силно влошаване на качеството на флуоресцентните микроскопски изображения.

14. Потвърдена е възможността за визуализиране на кръвоносни съдове на дълбочина до 600-700 nm под повърхността на мозъчната кора с биопоносими QD-проби и дву-фотон

възбудена флуоресцентна микроскопия. Потвърдени са предимствата на QD-PEG пред FITC-декстрана за визуализиране на капилярната мрежа в мозъка.

15. Потвърдена е възможността за визуализиране на тумори по ангиогенезата в експериментални животни с помощта на QD-проби.

ВСИЧКИ ПРИНОСИ СА С ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР

III. ПРИНОСИ ИЗВЪН ДИСЕРТАЦИОННИТЕ ТРУДОВЕ

НАУЧНО НАПРАВЛЕНИЕ: БИОМЕМБРАНИ

1. Доказана е връзката между локализацията/подвижността (латерална и вертикална) на алфа-токоферола (C16) в липидния бислой на мембраните и неговото антиоксидантно действие в биологични системи „ин витро” и „ин vivo”. Установено е, че както въглеродородната верига, така и хромановото ядро на алфа-токоферола са локализирани в хидрофобната част на липидния бислой. Показано е, че „имобилизирането” на алфа-токоферола в мембраните има двустранен ефект:

(а) това „имобилизиране” е причина за по-ниската антиоксидантна активност на C16, в сравнение с късоверижните му хомолози C1, C3 и C6 в окислителни системи „ин витро”;

(б) от друга страна, то забавя метаболизма на алфа-токоферола и извеждането му от организма, което удължава неговото антиоксидантно действие „ин vivo”.

(Статии № 3, 11, 20, 22; патент 1)

2. За първи път е показан междумембранен пренос на алфа-токоферола, като за целта е използвана спектроскопски анализ и моделна система, състояща се от „донорни” мембрани (моноламеларни липозоми, съдържащи алфа-токоферол) и „рецепторни” мембрани (мултиламеларни липозоми, несъдържащи алфа-токоферол, или микрозомни).

(Статии № 3, 5, 17, 19)

НАУЧНО НАПРАВЛЕНИЕ: СВОБОДНО-РАДИКАЛНИ ПРОЦЕСИ

A) РЕГУЛАЦИЯ

1. За първи път в света е показано, че протеин-кинази C и A опосредстват регулацията на липидната пероксидация в биомембраните, което хвърля нова светлина върху ендогенните механизми за контрол и защита от свободно-радикални процеси в организма.

(Статии № 2, 4, 14)

2. Проведено е систематично изследване на стабилизиращото действие на алфа-токоферола, екранираните феноли и оксибензимидазолите върху биомембраните. Класифицирани са мултифункционални свойства на алфа-токоферола, отговорни за ефективността на защита от оксидативен стрес:

(а) асиметрична локализация в липидния бислой;

(б) междумембранен и трансмембранен пренос;

- (в) синергизъм с водоразтворимите антиоксиданти (глутатион, карнозин);
- (г) регенериране от аскорбиновата киселина;
- (д) хелатиране на метални йони.

(Статии № 3, 12, 18)

3. Потвърдена е ролята на фенотиазините в регулацията на свободно-радикалните процеси в моделни системи и връзката им с модулацията на имунния отговор на макрофагите. Направено е систематично изследване, доказващо ролята на химичната структура на фенотиазините препарати за проява на прооксидантна или антиоксидантна активност. Работата е с потенциално клинично значение, тъй като разкрива един от възможните механизми за индуциране на странични ефекти от фенотиазините препарати.

(Статии № 42, 48, 131, 138, 139)

Б) РОЛЯ В ПАТОГЕНЕЗАТА

4. Потвърдена е ролята на свободно-радикалните процеси в туморогенезата. Публикувана е оригинална хипотеза (базираща се на описани в литературата факти, както и на собствени експериментални данни), обясняваща резистентността на раковите клетки на оксидативен стрес и индукция на апоптоза, както и податливостта на нормалните тъкани на тумороносителите на оксидативен стрес. Хипотезата се базира на два основни факта:

(а) наднормена активация на протеин-киназа С в раковите клетки и участието ѝ в регулацията на свободно-радикалните процеси в тях;

(б) миграция на ендогенните антиоксиданти от нормалните тъкани към тумора, повишаване на ендогенната антиоксидантна защита на раковите клетки и създаване на антиоксидантен дефицит в „нормалните“ околни тъкани.

Хипотеза е публикувана през 1988 г. и е с клинично значение. Протеин-киназа С е ключов ензим в пролиферацията на раковите клетки и неговото инхибиране води до намаляване на резистентността на раковите клетки на оксидативен стрес, което е от важно значение за радиотерапията и химиотерапията на туморните заболявания. Понастоящем някои изоензими на протеин-киназа С са основни таргети в химиотерапията на тези заболявания.

(Статия № 4, 82, 83)

5. Потвърдена е ролята на свободно-радикалните процеси в етиологията и патогенезата на някои мозъчни увреждания (инсулт, дегенеративни увреждания при стареене). Проведено е сравнително систематично изследване на нивото на природните антиоксиданти и продуктите на липидна пероксидация в различни дялове на мозъка на стари и млади животни и податливостта на мозъчните тъкани на оксидативен стрес. За първи път е показана синергичната роля на витамин Е и протеин-киназа С в регулацията на свободно-радикалните процеси в мозъчната тъкан, както и възможността за регенерация на витамин Е от ендогенните редуциращи еквиваленти (НАДФ.Н, НАД.Н, витамин С, тиолови производни). Проведен е сравнителен анализ на протективната роля на витамин Е и убихинолите срещу развитието на оксидативен стрес в мозъчната тъкан.

(Статия № 6)

6. Доказана е ролята на имобилизацията в развитието на оксидативен стрес в белите дробове, което е съпроводено с увреждане на бронхо-алвеоларния сърфактант. Потвърдена е ролята на витамин Е в забавянето и предотвратяването на този процес.

(Статии № 23, 24)

7. Доказана е ролята на свободно-радикалните процеси в етиологията и патогенезата на атерогенните заболявания. За първи път у нас е показано, че степента на свързване на алфа-токоферола с липопротеините с ниска плътност (ЛНП) е различна, в зависимост от степента на тяхното окислително модифициране. Установено е насищане на ЛНП с алфа-токоферол, което е индикация за потенциален специфичен механизъм на свързване между двата компонента.

За първи път в света е изследвана корелацията между продължителността на лаг-фазата на окисление на ЛНП „ин витро” и съдържанието на алфа-токоферол в тях. За целта е използвано математическо моделиране, базиращо се на модела на Esterbauer et al. (1992). ЛНП са изолирани от кръв на болни с исхемична болест на сърцето в проучване случай-контрола. Показано е, че лаг-фазата на окисление на ЛНП „ин витро” може да се използва като индикатор за оценка на тяхното окислително модифициране. Установена е също корелация между нивото на IgG автоантителата към окислително модифицирани ЛНП „ин виво” и продължителността на лаг-фазата на окисление на ЛНП „ин витро”. Разработеният тест може да бъде използван за диагностика на пациенти с повишени окислителни модификации на плазмените липопротеини (маркер за атерогенни увреждания), за доказване на необходимостта и проследяване на ефекта на антиоксидантна терапия.

(Статии № 26, 28, 29, 90, 110, 111, 113, 133, 134)

8. Проведено е систематично изследване (случай-контрола) на корелационните връзки между следните диагностични маркери за атерогенеза при пациенти с исхемична болест на сърцето: аполипопротеин В и липоразтворимите антиоксиданти – алфа-токоферол и бета-каротен. Установена е много добра корелация между плазмените нива на алфа-токоферола и аполипопротеин В. Публикувана е оригинална хипотеза за възможното специфично взаимодействие (тип „лиганд-рецептор”) между алфа-токоферола и аполипопротеин В и намаляване на афинитета между двата компонента при атерогенеза, което води до намаляване съдържанието на алфа-токоферол в ох-ЛНП и повишава тяхната податливост на оксидативен стрес.

(Статии № 26, 29)

9. Доказано е значението на вида на анестезията за предпазване на тъканите и телесните течности от развитие на оксидативен стрес по време на оперативна интервенция и в постоперативния период. Установено е, че фентанилът и дроперидолът не водят до индукция на оксидативен стрес в черния дроб и белите дробове, докато сместта от азотен двуокис и кислород (в съотношение 2:1) индуцира оксидативен стрес в тези два органа. Показано е, че комбинацията от дроперидол, фентанил, азотен двуокис и кислород (известна като невролептаналгезия) предизвиква минимални изменения в нивото на липидната пероксидация и

антиоксидантния статус на черния дроб и белите дробове. Този факт обяснява една от предпоставките за емпиричната селекция на невролептаналгезията като една от щадящите форми на анестезия, наложила се в клиничната практика.

(Статии № 25, 27, 86-89, 91-93, 108, 109)

10. Доказана е ролята на оксидативния стрес в етиологията и патогенезата на грипните вирусни инфекции. Потвърдено е значението на витамин Е в профилактика и терапията на заболяването.

(Статии № 31, 33, 34, 115)

В) РОЛЯ В БИОМЕДИНСКАТА ДИАГНОСТИКА

11. За първи път в света са използвани стабилни нитроксилни радикали за неинвазивно визуализиране на проникването на конвенционални лекарствени средства през кръвно-мозъчната бариера и тяхната локализация в различни дялове на мозъка. За целта са използвани експериментални животни и магнитно-резонансна (МР) томография. Показано е, че нитроксилният радикал TEMPO е подходящ спин-маркер за лекарствени средства, тъй като не повлиява съществено техния пермеабилитет за кръвно-мозъчната бариера и се характеризира със сравнително високо време на релаксация T_1 . Това позволява използването на TEMPO радикала за разработване на нискотоксични и сравнително безвредни методи за проследяване на локализацията на спин-белязаните лекарствени средства в мозъка в реално време с помощта на МР имиджинг. Едновременно с това, динамиката на МР-сигнала на нитроксилния радикал позволява да се оцени окислително-редукционния потенциал на мозъчната тъкан. Тези факти са от практическо значение за разработването на нови лекарствени средства против мозъчни заболявания.

Работата е отбелязана в декемврийския брой на *Chemical Biology*, 2008, в януарския брой на *Nature Asia Materials*, 2009 и в няколко японски вестника.

(Статии № 78, 79)

12. Проведено е систематично изследване на динамиката на ЕПР-сигнала на няколко стабилни нитроксилни радикала и нитроксил-белязани нитрозоуреи (противотуморни средства) „ин витро” и „ин vivo”. Разработена е оригинална методична постановка за проследяване динамиката на ЕПР-сигнала на нитроксилните радикали в кръвния ток на експериментални животни „ин vivo”. Методът е внедрен в ЕПР центъра на Медицинския факултет на Тракийския университет-Стара Загора.

(Статии № 80)

13. Разработен е оригинален метод за визуализиране на редокс-статуса на тъкани в интактни животни (под анестезия) с използване на нитроксилни радикали като редокс-сензори и МР томография. Методът е приложен за МР диагностика на тумори в експериментални животни. За първи път в света е публикувано пряко доказателство (на интактни бозайници), че туморните тъкани и „нормалните” тъкани на животните-тумороносители се характеризират с висок окислителен потенциал, докато тъканите на здрави животни се характеризират с висок

редукционен потенциал. Методът е подходящ за приложение в клиничната диагностична практика.

(Статии № 82, 83)

Г) МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ

14. Разработен е оригинален HPLC метод за определяне нивото на малоновия диалдехид в биологични обекти (тъканни хомогенати и телесни течности). Според цитиранията от чужди автори, методът е приложим не само за биомедицински, но и за индустриални цели (например, за определяне нивото на малоновия диалдехид в хранителни продукти).

(Статия № 30)

НАУЧНО НАПРАВЛЕНИЕ: БИОФОТОНИКА

А) ФЛУОРЕСЦЕНТЕН РЕЗОНАНСЕН ЕНЕРГЕТИЧЕН ПРЕНОС

15. Открит е емпирично нов феномен, който е използван за разработване на нов спектрофлуориметричен метод за количествен анализ на теломеразната активност в биологични препарати (клетъчни лизати и биологични течности). Методът се базира на оригинален дизайн на едноверижни олигонуклеотиди, състоящи се от 16 бази със секвенция, комплементарна на тази на теломерните повтори. Олигонуклеотидите са белязани в двата края с флуоресциращ маркер (Cy3/Cy3) или с гасител на флуоресценцията (IowaBlack/BHQ). Белязаните олигонуклеотиди могат да хибридизират с еднаква вероятност с първичния продукт на теломеразната реакция. Това води до намаляване на разстоянието между Cy3 и IowaBlack/BHQ в границите на Фьорстеровия радиус и последващ флуоресцентен резонансен енергетичен пренос между двата компонента. Флуоресценцията на средата се променя, което позволява да се определи количеството на теломеразния продукт. Методът дава възможност да се избегне дълготрайната и криеща риск от артефакти PCR процедура за амплификация на продукта, както и електрофорезата, използващи се в конвенционалните методи за анализ на теломеразната активност. Методът е с възможности за практическо приложение в предклиничната диагностика.

Акцентът в работата е поставен върху биофизичния феномен FRET и неговото прилагане за конструиране на подходящи молекулни проби и тяхното използване за разработване на оригинални биофизични подходи за образна диагностика. Работата не акцентира върху използването на разработения метод в конкретни биохимични и молекулярно-биологични експерименти!

(Статия № 71)

16. Използвана е оригинална методична постановка за доказване на специфичното взаимодействие на NK-2 пептида с отрицателно-заредените фосфолипиди, експресирани на повърхността на раковите клетки. Постановката се базира на използване на липозоми, изградени от фосфатидилхолин, фосфатидилсерин и белязан с флуорофор фосфатидилетаноламин. За целта е използвана FRET-двойката NBD/Rodamin. Проникването на NK-2 в липозомите води до увеличаване на дистанцията между двата флуорофора и

намаляване на ефективността на FRET между тях. Този факт се използва за оценка на специфичното взаимодействие на NK-2 пептида с клетъчната мембрана, което е в строга зависимост от концентрацията на отрицателно-заредените фосфолипиди. Изказано е предположението, че това би могло да бъде в основата на селективната цитотоксичност на NK-2 по отношение на тези ракови клетки.

Работата е с потенциално клинично значение. Понастоящем NK-2 се намира във фаза II на клинични изпитания като антибактериален препарат. Към известните бактерицидни свойства на NK-2 се добавя и противотуморен ефект.

(Статия № 61)

17. С помощта на потенциал-зависими флуоресцентни маркери е показано, че биоорганичната обвивка на флуоресцентните наночастици (квантови точки) повлиява митохондриалния потенциал на клетките и може да индуцира процеси на апоптоза и некроза.

(Статия № 85)

Б) ДВУФОТОН ВЪЗБУДЕНА ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ

18. Разработени са оригинални контрастни проби на базата на флуоресцентни наночастици (квантови точки). Пробите са приложени за визуализиране на кръвоносни съдове в мозъка с двуфотон-възбудена флуоресцентна микроскопия. Изследвана е ролята на биоорганичната обвивка на нанокристалите за тяхната колоидна стабилност, квантов добив и качество на флуоресцентните изображения.

(Статия № 85)

В) МУЛТИМОДАЛЕН ИМИДЖИНГ

19. Разработена е оригинална мултимодална контрастна проба на базата на квантови точки, конюгирани с хелатор за парамагнитни йони. Пробата се характеризира с висока колоидна стабилност във физиологични течности, висок квантов добив и T_1 релаксация. Приложена е за визуализиране на тумори в експериментални животни под анестезия с флуоресцентен имиджинг и МР томография. Постигнато е визуализиране на тумори с малки размери – около 2 mm в диаметър.

(Статия № 85)

Г) БИОСЕНЗОРИ

20. Публикувана е оригинална идея за предимствата на комбинацията от свръх-бързи биосензори и двуфотон-възбудена флуоресцентна микроскопия за изследване на природните феномени в мозъка – памет, сън, връзка между нервната активност и церебралния кръвен ток, мозъчни увреждания. Отзив за работата е публикуван в американското научно-популярно издание *BioPhotonics International*.

(Статии № 103, 104)

Д) ЛАЗЕР-ДОПЛЕРОВА ФЛОУМЕТРИЯ (методични аспекти)

21. Предложен е нов подход за обработване на експерименталните данни, получени с лазер-Доплерова флоуметрия на локалните изменения в церебралния кръвен ток под влияние на нервната активност. Нормализирането на сигнала към базовата линия се осъществява чрез изваждане и последващо интегриране от началната до крайната точка на хистограмата. Този подход дава възможност за по-добра и много по-реална оценка на ефекта на инхибитори и активатори на процеса, които повлияват не само специфичния сигнал, но и базовата линия. Новият подход се базира на анализа на множество експериментални данни.

(Статии № 35)

Е) МИКРОАРЕЙ АНАЛИЗ (методични аспекти)

22. Направен е теоретичен систематичен анализ на принципа, предимствата и недостатъците на микроарей анализа и неговото приложение в биомедицинската диагностика. Анализът е публикуван като самостоятелен раздел в *Encyclopedia of Molecular Medicine* (издание на Wiley VCH, 2005).

(Статии № 7, 100, 118)

Ж) ЕЛЕКТРОФОРЕЗА (методични аспекти)

23. Разработен е оригинален метод за определяне на теломеразната активност (маркер за бързо пролифериращи клетки и тъкани) с помощта на микрочип електрофореза. Направена е съпоставка с най-широко използвания метод за оценка на теломеразната активност, базиращ се на гел-електрофорезата. Формулирани са предимствата на микрочип електрофорезата за оценка на теломеразната активност. Разработеният нов метод би могъл да намери приложение в предклиничната диагностика на теломеразната активност в биопсични препарати. Единственото ограничение в настоящия момент е сравнително високата цена на апаратурата за микрочип електрофореза.

Акцентът в работата е поставен върху техническите (биофизични и физични аспекти) на метода и неговите характеристики (чувствителност, селективност, продължителност), а не върху неговото използване в конкретни биохимични експерименти!

(Статии № 60, 116)

НАУЧНО НАПРАВЛЕНИЕ: РЕЦЕПТОРНИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

24. Разработен е оригинален подход за практическо приложение на взаимодействията „лиганд-рецептор“ между растителните лектини и полизахаридните вериги на специфичните гликопротеини и гликолипиди, експресирани се на повърхността на раковите клетки. Селекционирани са два лектина (*Dolichos Biflorus Agglutinin*, *Soybean Agglutinin*), които показват висока специфичност и афинитет към левкемични клетки (изолирани от пациенти с остра лимфобластна левкемия, хронична миелоидна левкемия и лимфома на Burkitt). Показано е, че

тези лектини не взаимодействат с нормалните лимфоцити. За първи път в света, тези лектини са приложени за разделяне и пречистване на нормални клетки от левкемични с лектин-афинитетна хроматография. Автоматизирането на метода и обезпечаването на висока стерилност биха могли да го направят приложим при пречистването на нормални клетки от левкемични при автоложните трансплантации.

(Статии № 38-40, 43, 114)

25. За първи път в света е изследвана връзката между структурата и биологичната активност (степен на свързване с раковите клетки, цитоаглутинация и цитотоксичност) на лектина *Wheat Germ Agglutinin* (WGA). За целта са използвани три „изоформи“ на WGA (WGA-1, WGA-2, WGA-3), различаващи се структурно по вида на няколко аминокиселинни остатъка, локализирани в участъка, отговорен за свързването им с полизахаридните вериги на клетъчните рецептори. Установена е корелация между степента на свързване на „изолектините“ с раковите клетки и скоростта на цитоаглутинация.

(Статии № 41)

НАУЧНО НАПРАВЛЕНИЕ: МИКРОЦИРКУЛАЦИЯ И НЕРВНА АКТИВНОСТ

26. Използвана е оригинална методична постановка (на експериментални животни под анестезия) за изследване на връзката между нервната активност и церебралния кръвен ток в соматосензорната зона на мозъка. Изследвана е връзката между акционния потенциал и локалните изменения на кръвния ток при нервна активност в състояние на нормокапния, хиперкапния и хипоксия. Потвърден е вазодилатиращият ефект на хиперкапнията в състояние на покой, както и локалната вазодилатация в състояние на нервно възбуждане.

(Статии № 32)

27. На базата на оригинална експериментална електрофизиологична постановка (на животни под анестезия) е потвърдена ролята на циклооксигеназите (COX-1 и COX-2) в опосредстване на връзката между нервната активност и церебралния кръвен ток в условия на нормокапния, хиперкапния и хипоксия. За целта, за първи път в света е използван специфичният инхибитор на COX-2 Rofecoxib. Публикувана е оригинална хипотеза за метаболитните пътища, опосредстващи връзката между хиперкапнията и промените в церебралния кръвен ток.

(Статии № 36, 37)

28. Потвърдена е ролята на синтазата на азотния оксид (NOS) в опосредстване на връзката между нервната активност и церебралния кръвен ток в условия на нормоксия и хипоксия. Публикувана е оригинална хипотеза за ролята на супероксидния радикал и радикала на азотния оксид в опосредстване на връзката между хипоксията и промените в церебралния кръвен ток при нервна активност.

(Статии № 81, 84)

НАУЧНО НАПРАВЛЕНИЕ: ТРАНСФЕКЦИИ

29. Проведено е оригинално систематично проучване на възможностите за директна трансфекция в живи клетки на олиго-ДНК, ДНК-ензими и малки интерфериращи РНК-и, след модифициране на молекулите и/или конюгирането им с малки пептиди, въглехидрати или полиамини. За целта е използван голям набор от молекулни модели, чийто дизайн е оригинален. Селекционирани са най-подходящите за трансфекция структури. Работата е защитена с патент. Отзиви за работата са публикувани в няколко научни списания. Работата е с клинично значение, с оглед на бързоразвиващите се лекарствени средства на генна основа. **Акцентът в работата е поставен върху моделиране на структурата на олигонуклеотидите с цел повишаване на тенхния пермеабилитет за клетъчните мембрани, а не върху използването им в конкретни молекулярно-биологични експерименти!**

(Статии № 8, 44-46, 57-59, 123-126; патент № 2)

НАУЧНО НАПРАВЛЕНИЕ: КЛЕТЪЧНА СИГНАЛИЗАЦИЯ И АПОПТОЗА

30. Проведено е систематично изследване на връзката между степента на свързване на растителния лектин абрин-А с ракови клетки, неговия цитоаглутиниращ и цитотоксичен ефект. За целта е използван голям набор от ракови клетъчни линии, изолирани от клетки на пациенти с остра лимфобластна левкемия, хронична миелоидна левкемия и лимфома на Burkitt. Установена е корелация между степента на диференциация на раковите клетки и посочените по-горе параметри. Направено е систематично проучване на механизмите, по които абрин-А индуцира апоптоза в клетките.

(Статии № 51)

31. Проведено е оригинално систематично изследване, доказващо ролята на протеинкиназа С ζ в регулацията на теломеразната активност при лимфома на Burkitt. Показано е, че двата ензима са в тясна регулаторна връзка и тяхното едновременно инхибиране би могло да доведе до значително потискане на пролиферацията на раковите клетки. Този факт е с потенциално значение за терапията на лимфомата на Burkitt.

(Статии № 49)

32. Проведено е оригинално систематично изследване, доказващо за първи път антипролиферативния ефект на някои психотропни вещества (фенотиазини). Установен е оригинален и важен за клиничната практика факт – фенотиазините индуцират апоптоза в левкемични лимфоцити, без да повлияват съществено жизнеността на нормалните лимфоцити. Ефектът им е свързан с потискане функцията на митохондриите, чиято висока активност е жизнено необходима за бързо пролифериращите ракови клетки. Това е доказателство за възможността тези лекарствени средства да бъдат използвани не само за подобряване на психичното състояние на раково-болните пациенти (каквото е тяхното конвенционално приложение в онкотерапията), но и да потискат развитието на туморите.

(Статии № 50)

33. Показано е, че диетичните фибри имат антипролифериращ ефект върху раковите клетки, като за целта са използвани две оригинално изолирани фракции от бамбук, съдържащи

съответно: ксилоза, ксилоолигозахариди и водоразтворими лигнини (фракция № 1) или глюкоза и целоолигозахариди (фракция № 2). Работата е с потенциално практическо приложение, с оглед на все по-широкото използване на диетичните фибри в профилактиката на редица заболявания.

(Статии № 47)

34. Публикувана е оригинална хипотеза, обясняваща развитието на резистентност към анти-левкемичния препарат Glivec. Хипотезата се основава не само на известни в литературата факти, но и на собствени експериментални данни. Базира се на крос-връзката между три ключови ензима, отговорни за пролиферацията на левкемичните клетки – bcr-abl тирозин-киназа, теломеразата и протеин-киназа C. Анализирани от клиничната и експерименталната практика факти са от значение за лечението с Glivec. За първи път е изказано предположението (и е подкрепено с факти), че под-праговите дози на Glivec могат да доведат до активиране на теломеразата и ускоряване на клетъчната пролиферация. Работата е селектирана в web-сайта на Novartis (ексклузивен производител на Glivec).

(Статии № 52, 53, 98)

НАУЧНО НАПРАВЛЕНИЕ: АНТИСЕНС ТЕХНОЛОГИИ И РНК ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

35. Конструирани са няколко антисенс олиго-ДНК (с оригинален дизайн), предизвикващи високоспецифично инхибиране на експресията и активността на bcr-abl/c-abl тирозин-киназата в човешки левкемични клетки, изолирани от пациенти с хронична миелоидна левкемия. Проведено е оригинално изследване на връзката между експресията на bcr-abl тирозин-киназата, теломеразата и асоциираните с нея протеини (танкираза, TRF-1, Tin-2), регулиращи достъпа й до теломерите. За първи път е показано, че инхибирането на експресията и активността на bcr-abl/c-abl тирозин-киназата в левкемичните клетки води до повишена активност на теломеразата, повишена експресия на танкиразата (протеин, улесняващ достъпа на теломеразата до теломерите) и понижена експресия на TRF-1 и Tin-2 (протеини, затрудняващи достъпа на теломеразата до теломерите). Този факт има огромно клинично значение. Той би могъл да обясни развитието на резистентност към анти-bcr/abl лекарствени средства и доказва, че комбинацията на лекарствени средства, потискащи едновременно експресията и/или активността на bcr-abl тирозин-киназата и теломеразата е по-добра и по-обещаваща стратегия при лечението на хроничната миелоидна левкемия.

(Статия № 52)

36. Конструирани са няколко малки интерфериращи РНК-и (siRNA) с оригинален дизайн, предизвикващи високоспецифична интерференция на гена за bcr-abl/c-abl тирозин-киназа в човешки левкемични клетки. За първи път в света е проведено сравнително изследване на експресията на различни онкогени, апоптозни/антиапоптозни фактори и фактори, отговорни за клетъчната пролиферация при човешки bcr-abl-позитивни клетки, третирани с анти-bcr-abl siRNA или тирозин-киназния инхибитор Glivec (производство на Novartis). Работата е включена в

доклада на European Association for Cancer Research – „The Best in the European Cancer Research 2005”.

(Статии № 53, 54)

37. Проведено е оригинално систематично изследване на много широк набор от симетрични и асиметрични, модифицирани в единия или двата края малки интерфериращи РНК-и (siRNA). Изследвана е тяхната антисенс-активност, стабилността им на нуклеазно разграждане, взаимодействието им с Dicer-ензима и трансфекцията им в живи клетки. За първи път е показано, че някои модифицирани 27-nt двойно-верижни РНК-и (27-nt dsRNA) са много по-стабилни в серум и имат много по-дълготраен антисенс-ефект, в равнение с конвенционалните 21-nt siRNA и немодифицираните 27-nt dsRNA. В работата са използвани практически всички възможни комбинации от аминокислотни модифицирани в единия или двата края 27-nt dsRNA, както и SH-модифицирани и холестерол-модифицирани dsRNA. Селекционирани са най-добрите аминокислотни модифицирани 27-nt dsRNA, характеризирани се с най-висока и дълготрайна антисенс-активност, най-висока стабилност в серум и клетъчна среда, и улеснен дайсинг. Селекционираните структури са предложени като най-подходящи за конюгиране с малки молекули, улесняващи директното проникване на РНК в клетките, без използването на допълнителни трансфекционни техники (като катионни липиди, които са известни със своята токсичност, или електропорация, която е практически неприложима „ин виво”). За доказването на тази възможност са използвани няколко 27-nt dsRNA, конюгирани с холестерол в единия край. Публикувана оригинална хипотеза, обясняваща защо модифицираните в 5'-сенс края 27-nt dsRNA проявяват по-висока антисенс-активност от останалите модификации.

Работата е защитена с патенти и е с практическо приложение във фармацията – за разработване на лекарствени средства на генетична основа.

Акцентът в работата е поставен върху моделиране на структурата на siRNA с цел повишаване на тенжния пермеабилитет за клетъчните мембрани, а не върху използването им в конкретни молекулярно-биологични експерименти!

(Статии – № 73-76, 129; патенти – № 7, 8)

МЕТОДИ, ИЗПОЛЗВАНИ ПРИ РАЗРАБОТКАТА НА ТРУДОВЕТЕ

ЕПР спектроскопия, магнитно-резонансна томография, електрофореза (клетъчна, гел, микрочип), лазер-Доплерова флоуметрия, флуоресцентна конфокална микроскопия, двуфотон-възбудена флуоресцентна микроскопия, флоу-цитометрия, електрофизиологични методи, афинитетна хроматография, трансмисионна електронна микроскопия, спектрофотометрия, спектрофлуориметрия, хемилуминесцентна спектроскопия, микройрей-анализ, RT-PCR, имуноблот анализ и др.

Използвани са живи клетки (макрофаги, лимфоцити, алвеолоцити, хепатоцити, култивирани ракови клетки и др.), нативни субклетъчни фракции (микрозомни, митохондрии, саркоплазматичен ретикулум, синаптозоми, плазматични мембрани, бронхоалвеоларен лаваж),

изкуствени мембрани (липозоми, мицели), плазмени липопротеини, кръв, серум, плазма, тъканни хомогенати, експериментални животни (мишки и плъхове).

ИМПАКТ ФАКТОР, ЦИТИРАНИЯ И ОТЗИВИ ЗА ТРУДОВЕТЕ

1. Общ импакт фактор – 360.8

Импакт фактор на трудовете, представени за рецензиране в конкурса за професор – 238.1

2. Индивидуален импакт фактор – 91.06

Индивидуален импакт фактор на трудовете, представени за рецензиране в конкурса за професор – 64.97

3. Общ брой забелязани цитирания (без изчерпване) – над 1150

Цитирания на трудовете, представени за рецензиране в конкурса за професор (без изчерпване) – над 600

4. Общ брой на отзивите – 45

Отзиви за трудовете, представени за рецензиране в конкурса за професор - 13

УЧЕБНИ ПОМАГАЛА ЗА СТУДЕНТИ

1. „Свободно-радикални процеси и антиоксидантна защита” – помощни материали към практикума и семинарните занятия по биофизика за студенти по медицина, фармация и биология (магистърски курс)

2. „Основи на молекулярния имиджинг” – помощни материали към практикума и семинарните занятия по биофизика за студенти по медицина, фармация и биология (магистърски курс)

УЧЕБНИ ПРОГРАМИ И ТЕСТОВЕ ЗА СТУДЕНТИ

1. Учебна програма по „Биофизика” за студенти от специалността „Медицина” (магистърски курс)

2. Учебна програма по „Биофизика” за студенти от специалността „Медицинска сестра” (бакалавърски курс)

3. Проект на учебна програма по „Биофизика” за придобиване на специалност „Биофизика” в системата на здравеопазването.

4. Тестове по „Биофизика” за студенти от специалността „Медицина” (магистърски курс).

Р. Бакалова

Справка за научните приноси

Май, 2011