

РЕЗЮМЕТА НА НАУЧНИТЕ ТРУДОВЕТЕ И ПУБЛИКАЦИИТЕ

на ас. д-р Десислава Анри Лазарова

във връзка с участие в конкурс за заемане на академичната длъжност „доцент“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.1. Физически науки и научна специалност „Биофизика и медицинска физика“, обявен в ДВ бр. 99 от 20 ноември 2020 г.

I. Публикации в издания реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (Web of Science и Scopus).

(публикации *извън* дисертационен труд за придобиване на ОНС “доктор”)

1. **Lazarova D., S. Semkova, G. Zlateva, Higashi Tatsuya, I. Aoki, R. Bakalova.** Quantum sensors to track total redox-status and oxidative stress in cells and tissues using EPR, MRI and optical imaging, *Analytical Chemistry*, 2021 (accepted for publication). IF= 6.785

Общият антиоксидантен (редуциращ) капацитет и нивото на оксидативен стрес на биологичните обекти (клетки, тъкани, телесни течности) са едни от най-често анализирани параметри в биологичните науки. Разработването на високочувствителни молекулярни сонди и аналитични методи за регистрация на тези параметри е бързо развиващ се сектор на научноизследователската и развойна индустрия. Целта на настоящото проучване беше да се разработят биосензори за проследяване на общия антиоксидантен (редуциращ) капацитет и/или нивото на оксидативен стрес в биологични обекти с помощта на EPR, MRI и оптичен имиджинг. Описана е двукомпонентна сензорна система: (i) сензор за общ антиоксидантен (редуциращ) капацитет TRC – QD@CD-TEMPO; и (ii) сензор за нивото на оксидативен стрес – OxiStress – QD@CD-TEMPOH. Структурата на двата редокс-сензора е от малки по размер квантови точки (QD), обвити с функционализиран с нитроксид циклодекстрин (парамагнитния CD-TEMPO или диамагнитен CD-TEMPOH), конюгирани с трифенилфосфониеви групи (TPP). TPP групи са добавени за постигане на вътреклетъчно проникване и митохондриална локализация. Нитроксидите взаимодействат едновременно с различни окислителни и редуктори, а сензорите се трансформират от парамагнитна радикалова форма (QD@CD-TEMPO) в диамагнитна хидроксиламинна форма (QD@CD-TEMPOH) и обратно, съгласно редокс-цикъла на нитроксидите. Тези трансформации са придружени от динамика на техните контрастни характеристики, дължаща се на гасенето на флуоресценцията на QD от нитроксидния радикал. TRC сензорът се прилага за EPR анализ на клетъчния редокс-статус *in vitro* на изолирани клетки с различен пролиферативен индекс, както и за неинвазивен MRI на редокс-дисбаланс и тежък оксидативен стрес *in vivo* при мишки с бъбречна дисфункция.

Total redox capacity (TRC) and oxidative stress (OxiStress) of biological objects (such as cells, tissues, body fluids) are one of the most frequently analyzed parameters in the life science. Development of highly sensitive molecular probes and analytical methods for detection of these parameters is a rapidly growing sector of BioTech R&D industry. The aim of the present study was to develop quantum sensors for tracking the TRC and/or OxiStress in living biological objects using EPR, MRI, and optical imaging. We describe a two-set sensor system: (i) TRC sensor – QD@CD-TEMPO; and (ii) OxiStress sensor – QD@CD-TEMPOH. Both redox-sensors are composed of small-size quantum dots (QDs), coated with multi-nitroxide-functionalized cyclodextrin (paramagnetic CD-TEMPO or diamagnetic CD-TEMPOH) conjugated with Triphenylphosphonium (TPP) groups. The TPP-groups were added to achieve intracellular delivery and mitochondrial localization. Nitroxide residues interact simultaneously with various oxidizers and reducers, and the sensors are transformed from paramagnetic radical form (QD@CD-TEMPO) into diamagnetic hydroxylamine form (QD@CD-TEMPOH) and vice-versa, due to nitroxide redox-

cycling. These chemical transformations are accompanied by a characteristic dynamics of their contrast features due to quenching of QD fluorescence by nitroxide radical. TRC sensor was applied for EPR analysis of cellular redox-status *in vitro* on isolated cells with different proliferative index, as well as for non-invasive magnetic resonance imaging of redox imbalance and severe oxidative stress *in vivo* on mice with renal dysfunction.

2. Bakalova R., S. Semkova, D. Ivanova, Z. Zhelev, T. Miller, T. Takeshima, S. Shibata, **D. Lazarova**, I. Aoki, T. Higashi. Selective targeting of cancerous mitochondria and suppression of tumor growth using redox-active treatment adjuvant, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, ID 6212935, <https://doi.org/10.1155/2020/6212935>. IF=5.076

Веществата, които повлияват редокс-статуса на клетките и техните комбинации, например хинон/аскорбат и менадион/аскорбат (М/А; наричан още Аратоне[®]), заслужават внимание заради способността си да убиват раковите клетки, без да влияят върху жизнеспособността на нормалните клетки, проявявайки синергичен ефект. Основният механизъм на действие на М/А спрямо раковите клетки до момента не се е свързвал с митохондриите. Целта на настоящото изследване е да проучи дали тази комбинация повлиява върху функцията на митохондриите на туморните клетки. Експериментите са направени върху ракови клетъчни линии (Jurkat, Colon26 и MCF7) и нормални клетки (нормални лимфоцити, FHC и MCF10A), третирани с различни концентрации на менадион, аскорбат и/или тяхната комбинация (2/200, 3/300, 5/500, 10/1000 и 20/2000 μM / μM от М/А). М/А в комбинация специфично потиска растежа на туморните клетки, като се наблюдава синергичен ефект. Приложената комбинация на двата препарата не влияе на жизнеспособността на нормалните клетки при фармакологични концентрации. При третираните с М/А туморни клетки цитостатичният/цитотоксичният ефект е придружен от (i) производство на митохондриален супероксид във високи концентрации (до 15 пъти над контролното ниво), (ii) значително намаляване на митохондриалния мембранен потенциал, (iii) намаляване на нивата на АТФ, сукцинат, NADH и NAD⁺ и (iv) намалена експресия на PD-L1 (експресиран върху повърхността на туморните клетки и имунните клетки при различните видове онкологични заболявания). Изброените ефекти са дозо-зависими. Инхибирането на NQO1 от дикумарол повишава нивата на митохондриалния супероксид и увеличава чувствителността на туморните клетки към М/А. При нормалните (неракови) клетки М/А индуцира относително ниско и независимо от дозата повишаване на митохондриалния супероксид и „слаб“ оксидативен стрес. Тези данни предполагат, че противотуморният ефект на М/А е резултат от специфичен механизъм, тясно свързан с митохондриите на туморните клетки. При ниски/умерени дози на М/А (1/100-3/300 μM / μM), които могат да се достигнат с перорален прием и парентерално (инжекционно), М/А увеличава чувствителността на туморните клетки към конвенционалните противоракови средства, което се проявява синергично, с увеличена цитотоксичност, придружена от повишена индукция на апоптоза. Изследвани са комбинации от М/А с 13 противоракови лекарства (АВТ-737, барасертиб, блеомицин, BEZ-235, бортезомиб, цисплатин, еверолимус, ломустин, лонафарниб, MG-132, MLN-2238, палбоциклиб и PI-103). Ниските/умерени дози на М/А не предизвикват необратима цитотоксичност в туморните клетки, но причиняват необратими метаболитни промени, включително: (i) намаляване на сукцината и NADH, (ii) деполяризация на митохондриалната мембрана и (iii) свръхпродукция на супероксид, само в митохондриите на раковите клетки. В допълнение, М/А потиска туморния растеж *in vivo*, след перорално приложение при мишки с меланом, лекувани с препарати понижаващи експресията на PD-L1 в меланомните клетки. Експерименталните данни показват увеличаване чувствителността на туморните клетки към конвенционалните химиотерапевтици след прилагане на М/А, като междуременно не повлияват нераковите клетки. Предполагаме, че М/А обусловените противотуморни ефекти са предизвикани от окислително-редукционното взаимодействие на двете вещества. Предполага се, че М/А има отношение и към имунната реакция, правейки раковите клетки „достъпни“ и респективно уязвими към естествения имунен отговор.

Redox-active substances and their combinations, such as of quinone/ascorbate and in particular menadione/ascorbate (M/A; also named Apatone[®]), attract attention with their unusual ability to kill cancer cells without affecting the viability of normal cells as well as with the synergistic anticancer effect of both molecules. So far, the primary mechanism of M/A-mediated anticancer effects has not been linked to the mitochondria. The aim of our study was to clarify whether this “combination drug” affects mitochondrial functionality specifically in cancer cells. Studies were conducted on cancer cells (Jurkat, Colon26, and MCF7) and normal cells (normal lymphocytes, FHC, and MCF10A), treated with different concentrations of menadione, ascorbate, and/or their combination (2/200, 3/300, 5/500, 10/1000, and 20/2000 $\mu\text{M}/\mu\text{M}$ of M/A). M/A exhibited highly specific and synergistic suppression on cancer cell growth but without adversely affecting the viability of normal cells at pharmacologically attainable concentrations. In M/A-treated cancer cells, the cytostatic/cytotoxic effect is accompanied by (i) extremely high production of mitochondrial superoxide (up to 15-fold over the control level), (ii) a significant decrease of mitochondrial membrane potential, (iii) a decrease of the steady-state levels of ATP, succinate, NADH, and NAD^+ , and (iv) a decreased expression of programmed cell death ligand 1 (PD-L1)—one of the major immune checkpoints. These effects were dose dependent. The inhibition of NQO1 by dicoumarol increased mitochondrial superoxide and sensitized cancer cells to M/A. In normal cells, M/A induced relatively low and dose-independent increase of mitochondrial superoxide and mild oxidative stress, which seems to be well tolerated. These data suggest that all anticancer effects of M/A result from a specific mechanism, tightly connected to the mitochondria of cancer cells. At low/tolerable doses of M/A (1/100-3/300 $\mu\text{M}/\mu\text{M}$) attainable in cancer by oral and parenteral administration, M/A sensitized cancer cells to conventional anticancer drugs, exhibiting synergistic or additive cytotoxicity accompanied by impressive induction of apoptosis. Combinations of M/A with 13 anticancer drugs were investigated (ABT-737, barasertib, bleomycin, BEZ-235, bortezomib, cisplatin, everolimus, lomustine, lonafarnib, MG-132, MLN-2238, palbociclib, and PI-103). Low/tolerable doses of M/A did not induce irreversible cytotoxicity in cancer cells but did cause irreversible metabolic changes, including: (i) a decrease of succinate and NADH, (ii) depolarization of the mitochondrial membrane, and (iii) overproduction of superoxide in the mitochondria of cancer cells only. In addition, M/A suppressed tumor growth in vivo after oral administration in mice with melanoma and the drug downregulated PD-L1 in melanoma cells. Experimental data suggest a great potential for beneficial anticancer effects of M/A through increasing the sensitivity of cancer cells to conventional anticancer therapy, as well as to the immune system, while sparing normal cells. We hypothesize that M/A-mediated anticancer effects are triggered by redox cycling of both substances, specifically within dysfunctional mitochondria. M/A may also have a beneficial effect on the immune system, making cancer cells “visible” and more vulnerable to the native immune response.

3. Nikolova B., S. Semkova, I. Tsoneva, E. Stoyanova, P. Lefterov, **D. Lazarova**, Z. Zhelev, I. Aoki, T. Higashi, R. Bakalova. Redox-related molecular mechanism of sensitizing colon cancer cells to camptothecin analog SN38, *Anticancer Res*, 2020, 40(9), 5159-5170, IF=1.994

Цел: Целта на това изследване е да изясни, дали може да бъде повишена ефективността на химиотерапевтика SN38 върху клетки от рак на дебело черво в комбинация с електропорация (EP).

Материали и методи: Клетките са третирани със SN38, EP – поотделно и в комбинация за 24/48 часа. Конвенционални аналитични тестове са направени за: клетъчна преживяемост, актинов цитоскелет, нива на митохондриален супероксид и хидропероксидите, общ глутатион, експресия на фосфатидилсерин, увреждания на ДНК и експресия на мембранни ABC преносители.

Резултати: Комбинацията от EP и SN38 повлиява жизнеспособността на клетките и целостта на цитоскелета. Този ефект е придружен от: (i) висока продукция на вътреклетъчен супероксид и хидропероксици и изчерпване на глутатиона; (ii) увеличено увреждане на ДНК и апоптична/фероптична клетъчна смърт; (iii) промени в експресията на мембранни ABC преносители – повишени нива на SLCO1B1, вследствие задържане на SN38 в клетките.

Заклучение: Противораковият ефект на комбинираното лечение на SN38 и EP е свързан с промени в

редокс-регулацията на раковите клетки, водещи до клетъчна смърт чрез апоптоза и/или фероптоза. Следователно, едновременното прилагане на електропорацията с конвенционални химиотерапевтици е перспективно, с цел повишаване на тяхната ефективност.

Background/Aim: The aim of this study was to elucidate the possibility of sensitizing colon cancer cells to the chemotherapeutic drug SN38 and investigate its mechanism of action after combined treatment with electroporation (EP).

Materials and Methods: Cells were treated with SN38, EP and their combination for 24/48 h. The cell viability, actin cytoskeleton integrity, mitochondrial superoxide, hydroperoxides, total glutathione, phosphatidyl serine expression, DNA damages and expression of membrane ABC transporters were analyzed using conventional analytical tests.

Results: The combination of EP and SN38 affected cell viability and cytoskeleton integrity. This effect was accompanied by: (i) high production of intracellular superoxide and hydroperoxides and depletion of glutathione; (ii) increased DNA damage and apoptotic/ ferroptotic cell death; (iii) changes in the expression of membrane ABC transporters – up-regulation of SLCO1B1 and retention of SN38 in the cells.

Conclusion: The anticancer effect of the combined treatment of SN38 and EP is related to changes in the redox-homeostasis of cancer cells, leading to cell death via apoptosis and/or ferroptosis. Thus, electroporation has a potential to increase the sensitivity of cancer cells to conventional anticancer therapy with SN38.

4. Ivanova D., Z. Yaneva, **D. Lazarova**. Investigation of anti-proliferative effects of natural products quercetin hydrate and catechin hydrate on leukemia lymphocytes, *Revista de Chimie*, 2020, 71(11), 87-93, <https://doi.org/10.37358/RC.20.11.8377>. IF=1.755

Основният проблем на конвенционално прилаганата противотуморна терапия е липсата на селективност и индуцирането на вредни странични ефекти върху нормалните (неракови) клетки и тъкани. През последните години усилията са насочени към намиране на подходящ подход за селективно (таргетно) въздействие върху намаляване на жизнеспособността на раковите клетките. В тази връзка естествените билкови продукти представляват голям интерес поради ниската им цитотоксичност към нормалните клетки и тъкани и техния потенциал като добавки към конвенционалните химиотерапевтици. Добре известно е, че флавоноидите проявяват различни биологични активности, като антиоксидантно, антибактериално, противовъзпалително, антивирусно и противораково действие. В настоящото проучване са изследвани ефектите от ниски концентрации на кверцетин хидрат и катехин хидрат върху жизнеспособността на левкемични лимфоцити с цел изясняване на потенциала им за включване при синтезиране на нови биосъвместими нано-формули.

The major problem of conventional cancer therapy is lack of selectivity and induction of harmful side-effects on normal (healthy) cells and tissues. In the recent years, scientific efforts are focused to find a proper approach for highly selective influence on cell viability, as well as induction of cell death in cancer cells only. In this regard, natural herbal products are of great interest due to their low cytotoxicity to normal cells and tissues and their potential as supplements to conventional chemotherapeutics. It is well known that flavonoids exhibit various biological activities, such as anti-oxidative, anti-bacterial, anti-inflammatory, anti-viral and anti-cancer, and may play a role in cancer prevention. In the present study, the effects of low concentrations of quercetin hydrate and catechin hydrate on cell viability of leukemia lymphocytes were investigated, in order to provide an experimental basis for their future incorporation into newly-synthesized biocompatible nano-formulations.

5. Zhelev Z., E. Georgieva, I. Aoki, M. Gulubova, T. Higashi, R. Bakalova, **D. Lazarova**, S. Semkova. "Redox-imaging" to distinguish cells with different proliferative indexes: Superoxide, Hydrogen Peroxide, and Their Ratio as Potential Biomarkers, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, ID 6373685, <https://doi.org/10.1155/2019/6373685>. IF=5.076

Настоящото проучване е насочено към разработването на методика за използване на EPR за визуализиране и оценка на клетъчния редокс-статус на изолирани клетъчни линии с различен пролиферативен индекс. Използвани са три нитроксидни радикала: (а) mito-TEMPO – проникващ през клетъчната мембрана и локализиращ се предимно в митохондриите; (б) methoxy-TEMPO – проникващ през клетъчната мембрана и разпределящ се произволно между цитоплазмата и вътреклетъчните органели; (в) carboxy-PROXYL (CPx) – непроникващ в живи клетки и равномерно разпределен в извънклетъчната среда. Експериментите с прилагане на нитроксид-усилен EPR са проведени на единадесет клетъчни линии с различен пролиферативен индекс и редокс-статус, като резултатите са потвърдени и с конвенционални аналитични тестове. Данните показват, че раковите клетки и нераковите клетки се характеризират с напълно различен редокс-статус. Това може да бъде анализирано с EPR спектроскопия с използване на mito-TEMPO и methoxy-TEMPO, но не и CPx. Корелационният анализ показва, че интензивността на EPR сигнала на mito-TEMPO в клетъчни суспензии е тясно свързана с нивото на супероксид. Описаната методология позволява откриване на свръхпроизводство на супероксид в живите клетки и тяхното отдиференциране на базата на вътреклетъчния редокс-статус. Експерименталните данни потвърждават ролята на супероксида и хидропероксидите в клетъчната пролиферация и степента на злокачественост.

The present study was directed to the development of EPR methodology for distinguishing cells with different proliferative activities, using "redox imaging". Three nitroxide radicals were used as redox sensors: (a) mito-TEMPO – cell-penetrating and localized mainly in the mitochondria; (b) methoxy-TEMPO – cell-penetrating and randomly distributed between the cytoplasm and the intracellular organelles; and (c) carboxy-PROXYL – nonpenetrating in living cells and evenly distributed in the extracellular environment. The experiments were conducted on eleven cell lines with different proliferative activities and oxidative capacities, confirmed by conventional analytical tests. The data suggest that cancer cells and noncancer cells are characterized by a completely different redox status. This can be analyzed by EPR spectroscopy using mito-TEMPO and methoxy-TEMPO, but not carboxy-PROXYL. The correlation analysis shows that the EPR signal intensity of mito-TEMPO in cell suspensions is closely related to the superoxide level. The described methodology allows the detection of overproduction of superoxide in living cells and their identification based on the intracellular redox status. The experimental data provide evidences about the role of superoxide and hydroperoxides in cell proliferation and malignancy.

6. Ivanova D., Z. Zhelev, **D. Lazarova**, P. Getsov, R. Bakalova, I. Aoki. Vitamins C and K3: A powerful redox system for sensitizing leukemia lymphocytes to everolimus and barasertib, *Anticancer Res.*, 2018, 38(3), 1407-1414. IF=1.935

Цел: Последните проучвания предоставят убедителни доказателства, че комбинираното приложение на витамин С и провитамин К3 (менадион) има противоракова активност. Молекуларните механизми в основата на този процес все още не са добре изучени. Настоящото проучване има за цел да изследва ефекта на комбинацията от витамин С и провитамин К3 върху редокс-статуса на левкемични и нормални лимфоцити, както и техният сенсibiliзиращ ефект спрямо различни противоракови лекарства.

Материали и методи: Цитотоксичността на веществата се регистрира с оцветяване с трипаново синьо (багрилото прониква през клетъчната мембрана на мъртвите клетки) и измерване с автоматичен брояч на клетки. Апоптозата се анализира чрез флуоресцеин изотиоцианат-анексин V тест. Оксидативният стрес се детектира чрез определяне на вътреклетъчните нива на активни форми на кислорода и азота.

Резултати: Комбинираното приложение на 300 µM витамин С и 3 µM провитамин К3 намалява

жизнеспособността на левкемичните лимфоцити с ~ 20%, но не влияе върху жизнеспособността на нормалните лимфоцити. Всички комбинации от противотуморен препарат плюс витамини С и К3 се характеризират със синергичен цитотоксичен ефект на клетки Jurkat, в сравнение с клетки (от същата клетъчна линия), третирани само с лекарство за 24 часа. В случая на барасертиб и еверолимус този синергичен ефект се увеличава в рамките на 72 часа. Това е придружено и от силна индукция на апоптоза, намаляване на нивото на хидропероксиди и умерено повишено съдържание на протеин-карбонилни продукти в левкемичните лимфоцити.

Заклучение: Левкемичните лимфоцити са по-чувствителни на противотуморни препарати (еверолимус или барасертиб) при комбинирано приложение с витамини С и К3, в сравнение с нормалните лимфоцити. Комбинацията от витамин С и К3, с цел модулиране на редокс-хомеостазата, има перспектива да се прилага заедно с конвенционалната химиотерапия за допълнително сенсibiliзиране на левкемичните лимфоцити към лекарствените препарати.

Background/Aim: Recent studies provided convincing evidence for the anticancer activity of combined application of vitamin C and pro-vitamin K3 (menadione). The molecular pathways underlying this process are still not well established. The present study aimed to investigate the effect of the combination of vitamin C plus pro-vitamin K3 on the redox status of leukemia and normal lymphocytes, as well as their sensitizing effect for a variety of anticancer drugs. Materials and Methods: Cytotoxicity of the substances was analyzed by trypan blue staining and automated counting of live and dead cells. Apoptosis was analyzed by fluorescein isothiocyanate-annexin V test. Oxidative stress was evaluated by the intracellular levels of reactive oxygen and nitrogen species and protein-carbonyl products. Results: Combined administration of 300 μ M vitamin C plus 3 μ M pro-vitamin K3 reduced the viability of leukemia lymphocytes by ~20%, but did not influence the viability of normal lymphocytes. All combinations of anticancer drug plus vitamins C and K3 were characterized by synergistic cytotoxicity towards Jurkat cells, compared to cells treated with drug alone for 24 h. In the case of barasertib and everolimus, this synergistic cytotoxicity increased within 72 hours. It was accompanied by strong induction of apoptosis, but a reduction of level of hydroperoxides and moderately increased protein-carbonyl products in leukemia cells. Conclusion: Leukemia lymphocytes were more sensitive to combined administration of anticancer drug (everolimus or barasertib) plus vitamins C and K3, compared to normal lymphocytes. The combination of vitamin C plus K3 seems to be a powerful redox system that could specifically influence redox homeostasis of leukemia cells and sensitize them to conventional chemotherapy.

7. Дакова Р., Д. Лазарова, И. Авджиева, Г. Хаджидеков, Г. Златева, Ж. Желев, Р. Бакалова. Контраст-усилена магнитнорезонансна томография на експериментални модели. Част 1. Обработка на образи чрез използване на ImageJ скрипт [Contrast-enhanced magnetic resonance imaging on experimental models. Part 1. Data processing using ImageJ script], Рентгенология и Радиология, 2018, 57(4), 291-300. SJR= 0.110

В настоящата работа е описан алгоритъм за екстрахиране на контраст-усилени сигнали от магнитно-резонансни томографски (МРТ) образи, чрез използване на ImageJ скрипт – програма с отворен код, общодостъпна за изследователи и специалисти в областта на образната диагностика. Целта на статията е да запознае читателите с възможностите на програмата. В изследването са използвани експериментални животни под анестезия – здрави и с бъбречна дисфункция. МРТ измерванията са проведени на 7.0 Т МРТ за работа с малки животни. Обработката на образите дава възможност да се оцени степента на функционалните увреждания, на базата на промените в редокс-статуса на бъбречната тъкан и динамиката на контраста в бъбреците.

This study describes the algorithm for extracting contrast-enhanced signals from magnetic resonance images, using the ImageJ script – an open-source program available to researchers and specialists in imaging diagnostics. The aim of the article is to introduce readers to the program's capabilities. MRI was performed on experimental

animals under anesthesia – healthy mice and mice with renal dysfunction, using 7.0 Tesla MRI for small animals. Image processing allows assessment of the level of functional impairment, based on changes in redox-status of renal tissues and dynamics of contrast in the kidneys.

8. Zhelev Z., D. Ivanova, **D. Lazarova**, I. Aoki, R. Bakalova, T. Saga. Docosahexaenoic acid sensitizes leukemia lymphocytes to Barasertib and Everolimus by ROS-dependent mechanism without affecting the level of ROS and viability of normal lymphocytes, *Anticancer Res.*, 2016, 36(4), 1673-1682. IF=1.937

Целта на настоящото проучване е: (i) да се изследва възможността за сенсibiliзиране на левкемични лимфоцити спрямо противоракови лекарства, с използване на докозахексаенова киселина (DHA); (ii) да се намерят комбинации със синергичен цитотоксичен ефект върху левкемични лимфоцити, без или с много ниска цитотоксичност спрямо нормалните лимфоцити; (iii) и да се изясни ролята на активните форми на кислорода (ROS) за индукция на апоптоза и цитотоксичност чрез приложение на такива комбинации. Изследвани са 15 противотуморни препарата – конвенционални и ново поколение. Добре изразен синергичен цитотоксичен ефект се наблюдава след третиране на левкемични лимфоцити (Jurkat) с DHA в комбинация с: Баразертиб, Лонафарниб, Еверолимуc и Палбоциклиб. Подбрани са две комбинации, DHA с еверолимуc или барасертиб и е изследван техният ефект върху жизнеспособността на нормалните лимфоцити, както и върху производството на ROS и индукцията на апоптоза в двете клетъчни линии (левкемични и нормални лимфоцити). При избраните концентрации DHA, еверолимуc и барасертиб (прилагани поотделно) са цитотоксични към левкемични лимфоцити, но не и към нормалните такива. В левкемичните лимфоцити цитотоксичността на комбинациите препарати е съпроводена от силна индукция на апоптоза и производство на ROS. В нормалните лимфоцити приложените препарати – самостоятелно и в комбинация с DHA, не повлияват нивото на ROS и не предизвикват апоптоза. Доколкото е известно, настоящото проучване е първото, което изследва синергична ROS-зависима цитотоксичност между DHA и противотуморни препарати от ново поколение, като еверолимуc и барасертиб. Тези комбинации не предизвикват производство на ROS във високи концентрации в нормалните (неракови) клетки. Данните предполагат, че DHA може да се използва като допълнителен компонент в противораковата химиотерапия, позволявайки намаляване на терапевтичните дози на химиотерапевтика (еверолимуc и барасертиб), което ще доведе до намаляване на страничните ефекти.

The aim of the present study was: (i) to investigate the possibility of sensitizing leukemia lymphocytes to anticancer drugs using docosahexaenoic acid (DHA); (ii) to find combinations with synergistic cytotoxic effect on leukemia lymphocytes, without or with only very low cytotoxicity towards normal lymphocytes; (iii) and to clarify the role of reactive oxygen species (ROS) in the induction of apoptosis and cytotoxicity by such combinations. The study covered 15 anticancer drugs, conventional and new-generation. Well-expressed synergistic cytotoxic effects were observed after treatment of leukemia lymphocytes (Jurkat) with DHA in combination with: barasertib, lonafarnib, everolimus, and palbociclib. We selected two synergistic combinations, DHA with everolimus or barasertib, and investigated their effects on viability of normal lymphocytes, as well as on the production of ROS and induction of apoptosis in both cell lines (leukemia and normal). At the selected concentrations, DHA, everolimus and barasertib (applied separately) were cytotoxic towards leukemia lymphocytes, but not normal lymphocytes. In leukemia cells, the cytotoxicity of combinations was accompanied by strong induction of apoptosis and production of ROS. In normal lymphocytes, drugs alone and in combination with DHA did not affect the level of ROS and did not induce apoptosis. To our knowledge, the present study is the first to report synergistic ROS-dependent cytotoxicity between DHA and new-generation anticancer drugs, such as everolimus and barasertib, that is cancer cell-specific (particularly for acute lymphoblastic leukemia cells Jurkat). These combinations are harmless to normal lymphocytes and do not induce abnormal production of ROS in these cells. The data suggest that DHA could be used as a supplementary component in anticancer chemotherapy, allowing therapeutic doses of everolimus and barasertib to be reduced, minimizing their side-effects.

9. Bakalova R., Z. Zhelev, B. Nikolova, S. Murayama, **D. Lazarova**, I. Tsoneva, I. Aoki. Lymph node mapping using quantum dot-labeled polymersome, *Gen. Physiol. Biophys.*, 2015, 34(4), 393–398. IF=0.892

Настоящото изследване анализира дали модифицирани с хитозан полимерзоми са подходящи за локализация на лимфни възли в контекста на тяхното приложение при разработването на тераностични наноразмерни системи за доставка на лекарства (нано-DDS). Експериментите са проведени върху модели на колоректален карцином – мишки от линията Balb/c nude. Под анестезия в опашната вена на мишките са инжектирани QD⁷⁰⁵-полимерзоми (размер ~ 120 nm). Анализът е осъществен с Maestro EX 2.10 In Vivo Imaging System (филтър на възбуждане 435-480 nm и филтър на емисия 700 nm). В лимфните възли и в тумора е регистриран силен флуоресцентен сигнал, съответстващ на флуоресценцията на QD⁷⁰⁵. В областта на черния дроб се регистрира много слаб флуоресцентен сигнал. Полуживотът на QD⁷⁰⁵-полимерзомите е 6 ± 2 часа в кръвния поток и 11 ± 3 часа в лимфните възли. Данните показват, че приложението на полимерзомите като контрастен агент за локализация на лимфни възли е перспективна за разработване концепция.

The present study was designed to investigate whether poly-ion complex hollow vesicles (polymersomes), based on chemically-modified chitosan, are appropriate for lymph node mapping in the context of their application in the development of theranostic nanosized drug delivery systems (nano-DDS). The experiments were performed on Balb/c nude mice (colon cancer-grafted). The mice were subjected to anesthesia and quantum dot QD⁷⁰⁵-labeled polymersomes (d~120 nm) were injected intravenously via the tail vein. The optical imaging was carried out on Maestro EX Imaging System (excitation filter: 435–480 nm; emission filter: 700 nm). A strong fluorescent signal, corresponding to QD⁷⁰⁵ fluorescence, was detected in the lymph nodes, as well as in the tumor. A very weak fluorescent signal was found in the liver area. The half-life of QD⁷⁰⁵-labelled polymersomes was 6 ± 2 hours in the bloodstream and 11 ± 3 hours in the lymph nodes. The data suggest that polymersomes are very promising carriers for lymph node mapping using QD as a contrast agent. They are useful matrix for development of nano-formulations with theranostic capabilities.

10. Bakalova R., **D. Lazarova**, B. Nikolova, S. Atanasova, G. Zlateva, Z. Zhelev, I. Aoki. Delivery of size-controlled long-circulating polymersomes in solid tumors, visualized by quantum dots and optical imaging in vivo, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 2015, 29(1), 175-180. IF=0.373

Настоящото изследване анализира дали модифицирани с хитозан полимерзоми са подходящи за пасивно проникване в тумори, в контекста на приложението им като преносители на лекарствени средства. Проведени са *in vivo* експерименти върху модели на колоректален карцином – мишки от линията Balb/c nude, анализът е осъществен с Maestro EX 2.10 In Vivo Imaging System (филтър на възбуждане 435-480 nm и филтър на емисия 700 nm). Под анестезия мишките са инжектирани интравенозно с водоразтворими наночастици: (1) QD⁷⁰⁵-полимерзоми (среден размер ~ 120 nm; разпределение на размера ~ 10%) или (2) квантови точки QD⁷⁰⁵. При приложение на QD⁷⁰⁵ флуоресценцията се появява в областта на тумора в рамките на 1 min след инжектиране и изчезва напълно в рамките на 60 min. На 30^{та} минута се наблюдава силен флуоресцентен сигнал в черния дроб. Визуализирането на тумора с помощта на QD⁷⁰⁵ се осъществява, от ефективното навлизане на квантовата точка поради ангиогенезата. В случай на маркирани с QD⁷⁰⁵-полимерзоми веднага след инжектирането им се регистрира флуоресценция в областта на тумора и се наблюдава отлична визуализация на ангиогенната мрежа на цялото тяло. Силният флуоресцентен сигнал в областта на тумора се задържа 16 часа. Резултатите показват, че маркираните с QD⁷⁰⁵-полимерзоми се натрупват предимно в тумора, което се дължи на тяхната дълга циркулация и задържане в кръвния ток. В областта на черния дроб се открива много слаб флуоресцентен сигнал. Данните показват, че приложението на циркулиращи дълго време в кръвния ток полимерзоми, с контролиран размер, като

контрастни агенти и преносители на лекарствени антитуморни препарати, е обещаваща терапевтична стратегия.

The present study was designed to investigate whether poly-ion complex hollow vesicles (polymersomes), based on chemically modified chitosan, are appropriate for passive tumour targeting in the context of their application as drug carriers. The experiments were performed on colon cancer-grafted mice. The mice were subjected to anaesthesia and injected intravenously with water-soluble nanoparticles: (1) QD⁷⁰⁵-labelled polymersomes (average size ~120 nm; size distribution ~10%) or (2) native QD⁷⁰⁵. The optical imaging was carried out on Maestro EX 2.10 In Vivo Imaging System (excitation filter 435-480 nm; emission filter 700 nm, longpass). In the case of QD⁷⁰⁵, the fluorescence appeared in the tumour area within 1 min after injection and disappeared completely within 60 min. A strong fluorescent signal was detected in the liver on the 30th minute. The visualization of tumour using QD⁷⁰⁵ was based only on angiogenesis. In the case of QD⁷⁰⁵-labelled polymersomes, the fluorescence appeared in the tumour area immediately after injection with excellent visualization of blood vessels in the whole body. A strong fluorescent signal was detected in the tumour area within 16 hours. This indicated that QD⁷⁰⁵-labelled polymersomes were delivered predominantly into the tumour due to their long circulation in the bloodstream and enhanced permeability and retention effect. A very weak fluorescent signal was found in the liver area. The data suggest that size-controlled long-circulating polymersomes are very promising carriers for drug delivery in solid tumours, including delivery of small nanoparticles and contrast substances.

11. **Lazarova D., D. Stanoeva, A. Popova, D. Vasilev, M. Velitchkova.** UV-B induced alteration of oxygen evolving reactions in pea thylakoid membranes as affected by scavengers of reactive oxygen species, *Biologia Plantarum*, 2014, 58(2), 319-327 IF=1.849

Изследван е ефектът от UV-B облъчването при температури от 4 и 22°C върху светкавичните кислородни добиви, фотохимичната активност и енергийния трансфер на тилакоидни мембрани (ТМ) от грах с и без гасители активни кислородни видове (ROS). Използвани са три различни гасителя: диметил сулфоксид (DMSO), хистидин (His) и n-пропил галат (nPG). При облъчване на изолирани ТМ с UV-B, значително намаляват амплитудите на светкавичните кислородни добиви. Анализът на светкавичните кислородни добиви и кислородното избухване показва промени в количеството на S₀, както и промени в кинетиката на кислородното избухване при постоянно осветяване. Използваните гасители на ROS проявяват защитни ефекти в различна степен, като най-ефективен по отношение на светкавичните добиви спрямо UV-B радиацията е nPG. И при ниските, и при високите температури електронният транспорт през ФСII е по-чувствителен към UV-B облъчване в сравнение с фотосистемата I (ФСI). Анализът на 77K флуоресцентните спектри показва, че отношението F735/F685 се увеличава при UV-B третираните проби, причина за което вероятно е преразпределение на енергията между двете фотосистеми. Преразпределението на енергията може да бъде в резултат на разстиковането на ТМ и гасенето на флуоресценцията на ФСII. nPG в най-голяма степен запазва отделянето на кислород от ФСII в присъствие и отсъствие на екзогенни електронни акцептори.

The effect of UV-B irradiation at temperatures of 22 and 4°C on flash induced oxygen yields, photochemical activity, and energy transfer in pea thylakoid membranes in the absence and presence of scavengers of reactive oxygen species (ROS) was studied. Three different scavengers were used: dimethyl sulfoxide (DMSO), histidine (His), and n-propyl gallate (nPG). As result of the UV-B treatment of isolated membranes, the flash oxygen yields were considerably affected – the amplitudes decreased and the oscillation pattern was lost. The analysis of the flash oxygen yields and initial oxygen burst showed alterations of a number of oxygen evolving centers in the S₀ state as well as changes of decay kinetics of the oxygen burst under continuous irradiation. ROS scavengers exhibited more or less expressed protective effects, nPG being the most effective against UV-B induced damages of the flash oxygen yields. At both the temperatures, photosystem II (PSII) mediated electron transport was more sensitive to the UV-B treatment in comparison with photosystem I (PSI). The analysis of 77K fluorescence spectra showed that the fluorescence ratio F735/F685 increased by the UV-B treatment probably due to a redistribution of excitation

energy between both photosystems most likely caused by partial unstacking and due to a decrease of PSII fluorescence resulting from reaction center-type quenching. The nPG was the most powerful scavenger which protected the oxygen evolution capacity of PS II in the absence and presence of an exogenous electron acceptor to the highest extent.

12. Georgieva E., D. Ivanova, D. Lazarova, R. Bakalova, I. Aoki, Z. Zhelev. In vitro analysis of redox status of normal and tumor cells using nitroxide radicals and EPR spectroscopy, *Anticancer Res.*, 2014, 34(10), 5917-5919 (short paper). IF=1.826

Предмет на настоящото изследване е динамиката на EPR сигнала за регистриране на редокс-статус *in vitro* на нормални и ракови клетки с използване на два нитроксидни радикала (methoxy-TEMPO и mito-TEMPO). Нитроксидните радикали (които се характеризират с EPR контраст) участват в реакции на електронен обмен с множество вътреклетъчни окислителни и редуциращи еквиваленти. Скоростните константи на тези реакции определят динамиката на EPR сигнала в клетъчната суспензия. В нормалните, неракови клетки EPR сигналът на нитроксидите значително се понижава по време на инкубацията. При раковите клетки интензитетът на EPR сигнала е почти постоянен в рамките на два часа след инкубацията и не намалява значително. Данните показват, че нераковите клетки се характеризират с висок редуциращ капацитет и превръщане на нитроксидния радикал в диамагнитен хидроксиламин, докато раковите клетки се характеризират с висок оксидативен капацитет. Описаната методология е подходяща за диференциация на ракови от неракови клетки въз основа на техния редокс-статус.

In the present study we describe *in vitro* imaging analysis of cellular redox status in cancer and non-cancer cells using two redox-sensitive nitroxide derivatives (methoxy-TEMPO and mito-TEMPO) and electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. The nitroxide radical (which is characterized by EPR contrast) participates in electron-transfer reactions with a variety of intracellular oxidative and reducing equivalents. The rate constants of these reactions determine the EPR signal dynamics in cell suspension. In non-cancer cells, EPR signal intensity of nitroxides decreased significantly during incubation. In cancer cells, EPR signal intensity was almost constant within two hours of incubation and did not decrease significantly. The data suggest that non-cancer cells are characterized by a higher reducing activity to the nitroxide radical, while cancer cells are characterized by a higher oxidative activity. The described methodology is an appropriate sensing platform for differentiation of cancer from non-cancer cells based on their redox status.

13. Atanasova S., D. Lazarova, B. Nikolova, Z. Zhelev, T. Tsoneva, I. Aoki, R. Bakalova. In vivo visualization of electro-assisted delivery of nanoparticles in cancer using optical imaging, *Anticancer Res.*, 2014, 34(10), 5819-5821 (short paper). IF=1.826

В настоящото изследване е проследено дали електропорацията може да улесни проникването на лекарствени средства в тумори, използвайки като модел полимерзоми, маркирани с квантови точки (QD). Основната цел на експеримента е да се постигне увеличаване на локалната концентрация на противоракови лекарствени средства, за да се избегнат странични ефекти. Проведени са *in vivo* експерименти върху модели на колоректален карцином – мишки от линията Balb/c nude, като анализът е осъществен чрез Maestro EX Imaging система.

Електропорацията улеснява проникването на наночастиците в тумора. Значителна разлика в интензивността на флуоресценцията, дори 24 часа след третиране с наночастици, се наблюдава при мишки, с и без използване на електропорация в областта на тумора. Данните показват, че електро-асистираното проникване в ракови клетки, на циркулиращи дълго време в кръвния ток полимерзоми с контролиран размер, е обещаваща терапевтична стратегия при лечение на тумори.

The present study was designed to investigate whether electroporation can facilitate the delivery of drugs inside tumors using quantum dot (QD)-loaded polymersomes as a model. The main goal was to increase the local concentration of anticancer drugs avoiding side-effects. The experiments were performed on colon cancer-grafted mice (Balb/c) using the Maestro EX Imaging System. Electroporation facilitated the delivery of nanoparticles inside the tumor. A significant difference in the fluorescence intensity between electroporated and non-electroporated mice was observed in the cancer area even 24 hours after treatment with nanoparticles. The data suggest that electro-assisted delivery of size-controlled long-circulating polymersomes in cancer is a promising therapeutic strategy, especially for treatment of solid tumors.

14. Ivanova D., D. Lazarova, E. Georgieva, I. Aoki, Z. Zhelev, R. Bakalova. Systematic study on the cytotoxic and/or cytostatic effects of over twenty anticancer drugs: The crucial importance of the analytical approach and data processing, *Anticancer Res.*, 2014, 34(10), 5825-5827 (short paper). IF=1.826

Целта на настоящата работа е да се изясни цитотоксичния ефект на противоракови вещества, чрез използване на високо стандартизиран аналитичен подход и прецизна обработка на данните. Над двадесет противоракови препарата (ново поколение) са тествани върху култивирани клетъчни линии. Изследвани са клетъчната жизнеспособност и пролиферация и са приложени различни подходи при обработката на данните. Въз основа на конвенционалния подход за изчисляване на жизнеспособността на клетките, като процент от съответната контрола, всички лекарства могат да бъдат характеризирани като цитотоксични. Въз основа на ефекта на лекарствения средства върху броя на жизнеспособните клетки във всяка третирана проба (в сравнение с първоначалната стойност), препаратите могат да бъдат разделени в три групи: (i) цитотоксични лекарства; (ii) силно цитостатични лекарства, но не цитотоксични; (iii) лекарства без ефект върху клетъчната жизнеспособност и със сравнително слаб цитостатичен ефект. Изследването показва важноста на аналитичния подход и обработката на данните. Задължително е да се контролира ефектът на лекарствения средство върху броя на жизнеспособните ракови клетки по време на лечението, в сравнение с първоначалната стойност. В повечето случаи раковите клетки остават живи в присъствието на лекарствения препарат (в зависимост от избраната доза) и е въпрос на време тези клетки да започнат да се размножават отново след прекратяване на терапията.

The aim of this study was to clarify the real cytotoxic effect of anticancer substances by using a highly standardized analytical approach and precise data processing. Over twenty anticancer drugs (new generation) were tested on cultured cell lines. Cell viability and proliferation were analysed and different data processing was applied. Based on the conventional approach for calculation of cell viability as a percentage from the respective control all drugs could be characterized as cytotoxic. Based on the effect of the drugs on the number of viable cells in each treated sample (compared to the initial value) they could be divided in three groups: (i) cytotoxic drugs; (ii) strongly cytostatic drugs, but not cytotoxic; (iii) drugs without effect on cell viability and with comparatively weak cytostatic effect. The study shows the crucial importance of the analytical approach and the data processing. It is obligatory to control the effect of the drug on the number of viable cancer cells during the treatment, comparing to the initial value. In most cases, the cancer cells stay alive in the presence of the drug (depending on the selecting dose) and it is a matter of time these cells to start proliferating again after termination of the treatment.

15. Vetlichkova M., V. Doltchinkova, **D. Lazarova**, G. Mihailova, S. Doncheva, K. Georgieva. Effect of high temperature on dehydration-induced alterations in photosynthetic characteristics of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*, *Photosynthetica*, 2013, 51(4), 630-640. IF=1.007

Изследвани са ефектът от високата температура (НТ) и дехидратацията при „възкръсващо“ растение *Haberlea rhodopensis* върху функцията на фотосинтетичния апарат и възстановяването на мембранните свойства, отделянето на кислород и разпределението на енергията при рехидратация. Растенията, растящи при ниски светлинни интензитети в естественото им местообитание, бяха засушени до напълно сухо състояние с интензитет на светлината около $30 \mu\text{mol}(\text{фотон}) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, при стайна (23/20°C – ден/нощ) или висока (38/30°C – ден/нощ) температура. Нашите резултати показват, че НТ намалява фотосинтетичната активност на растенията при 38°C и има по-силен ефект, в сравнение със засушаването при 23°C. Изследването на изолирани тилакоиди показва преразпределение на енергията към ФСІ в резултат на третирането с висока температура, което се усилва при засушаването. Това може да се свърже с частично разстигане на тилакоидните мембрани (ТМ), което беше потвърдено с електронна микроскопия. В допълнение, плътността на повърхностния заряд на тилакоидните мембрани, изолирани от растенията, засушени при 38°C, е по-висока в сравнение с тази при растенията, засушени на 23°C, което е потвърждение за разстигането на ТМ. Регистрирано е намаляване на амплитудите на светкавичните кислородни добиви. След рехидратацията, възстановяването на асимилацията на CO_2 и бързата флуоресценция са по-добри, когато засушаването се извършва при оптимална температура, в сравнение с високата температура. В резултат на рехидратацията се наблюдава и частично възстановяване на амплитудите на светкавичните кислородни добиви, както и населеността на S_0 състоянието, при растенията, засушени при 23°C. Такова възстановяване не се наблюдава при растения, дехидратирани при 38°C.

The effect of high temperature (HT) and dehydration on the activity of photosynthetic apparatus and its ability to restore membrane properties, oxygen evolution, and energy distribution upon rehydration were investigated in a resurrection plant, *Haberlea rhodopensis*. Plants growing under low irradiance in their natural habitat were desiccated to air-dry state at a similar light intensity [about $30 \mu\text{mol}(\text{photon}) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$] under optimal day/night (23/20°C) or high (38/30°C) temperature. Our results showed that HT alone reduced the photosynthetic activity and desiccation of plants at 38°C and it had more detrimental effect compared with desiccation at 23°C. The study on isolated thylakoids demonstrated increased distribution of excitation energy to PSI as a result of the HT treatment, which was enhanced upon the desiccation. It could be related to partial destacking of thylakoid membranes, which was confirmed by electron microscopy data. In addition, the surface charge density of thylakoid membranes isolated from plants desiccated at 38°C was higher in comparison with those at 23°C, which was in agreement with the decreased membrane stacking. Dehydration led to a decrease of amplitudes of oxygen yields and to a loss of the oscillation pattern. Following rehydration, the recovery of CO_2 assimilation and fluorescence properties were better when desiccation was performed at optimal temperature compared to high temperature. Rehydration resulted in partial recovery of the amplitudes of flash oxygen yields as well as of population of S_0 state in plants desiccated at 23°C. However, it was not observed in plants dehydrated at 38°C.

16. Velitchkova M., **D. Lazarova**, G. Mihailova, D. Stanoeva, V. Dolchinkova, K. Georgieva. Characterization of energy transfer processes and flash oxygen yields of thylakoid membranes isolated from resurrection plant *Haberlea Rhodopensis* subjected to different extent of desiccation, Book Series: Advanced Topics in Science and Technology in China, In: Photosynthesis Research for Food, Fuel and the Future, 2013, 531-535, https://doi.org/10.1007/978-3-642-32034-7_112, ISBN 978-3-642-32033-0.

Възкръсващите растения са уникални със своята толерантност към изсушаване. Физико-химичните свойства на фотосинтетичния апарат са от решаващо значение за оцеляването на растенията при воден стрес. В настоящата работа е изследван ефектът при различната степен на засушаване върху преразпределението на енергията между двете фотосистеми и нивата на кислородно отделяне на изолирани тилакоидни мембрани (ТМ) от *Haberlea Rhodopensis*. Направено е сравнение на растения от различни местообитания в България. Разпределението на енергията между двете фотосистеми е изследвано с нискотемпературна 77К флуоресценция. Проследени са разликите на отношението F735/F685 в зависимост от степента на засушаване на растенията. Функционалността на ФСII и кислород-отделящия комплекс в процеса на засушаване са изследвани чрез измерване на светкавични кислородни добиви и кинетика на кислородно избухване на ТМ, изолирани от растения, засушени до 50% и 8% относително водно съдържание. Населеността на състоянията на S_i, както и пропуснатите и двойните удари се изчислени според модела на Кок и са сравнени за растенията от различни местообитания и с различно водно съдържание. Дискутирано е участието на „бързи“ (от граналните участъци на ТМ) и „бавни“ (от стромалните участъци на ТМ) реакционни центрове в процеса на отделяне на кислород и промяната на техния принос в резултат от засушаване.

The resurrection plants are unique with their extra desiccation tolerance. The physico-chemical properties of photosynthetic apparatus are of crucial importance for survival of plants upon water stress. In present work the effect of different extent of desiccation on the energy transfer properties and oxygen evolving capacity of isolated thylakoid membranes from resurrection plant *Haberlea Rhodopensis* are investigated. The plants from different habitats in Bulgaria are compared. Energy distribution and spillover between both photosystems are studied by means of 77 K chlorophyll fluorescence. The dependence of fluorescence ratio F735/F685 on the degree of desiccation of plants is also followed. Functionality of PSII and especially of oxygen-evolving apparatus under water deficit is estimated by flash oxygen yields and initial oxygen burst of thylakoid membranes isolated from plants desiccated up to 50% and 8% relative water content (RWC). Population of S_i states as well as the misses and the double hits are calculated according non-cooperative Kok's model and compared for plants from different habitats and different RWC. The results are discussed in terms of involvement of "fast" and "slow" centers from grana and stroma regions in oxygen evolution and alteration of their contribution as a result of desiccation.

17. Желев Ж., Г. Хаджидеков, Г. Златева, Д. Лазарова, Л. Спасов, Р. Бакалова. Флуоресцентна образна диагностика и нанофлуорофори. Част II: Мултифункционални и мултимодални наночастици и приложението им за визуализиране на живи биологични обекти [Fluorescent imaging and nanofluorophores Part II: Multifunctional and multimodal nanoparticles and their application for bioimaging], Рентгенология и Радиология, 2012, 51(1), 6-17. SJR= 0.100

Част II на обзора представя примери от експерименталната диагностична практика в последните 5-6 години, които доказват предимствата на флуоресцентните наночастици пред конвенционалните органични флуорофори за визуализиране на биологични таргети *in vivo* и *in situ*. Акцентът е поставен върху стратегиите за разработване на мултимодални и мултифункционални контрастни агенти на базата на квантови точки и тяхното приложение за едновременното визуализиране на два и повече биологични таргета с използването на комбинация от различни техники за диагностика: оптична образна диагностика/магнитно-резонансна томография (OI/MRI); оптична образна диагностика /позитрон-емисионна томография (OI/PET); OI/PET/MRI.

Part II of the review presents examples of the experimental diagnostic practice from the last 5-6 years, which proves advantages of fluorescence nanoparticles over conventional organic fluorophores for imaging of *in vivo* and *in situ* targets. The accent is focused on strategies for development of multifunctional and multimodal contrast agents based on quantum dots (QD) and their application for simultaneous visualization of two or more biological

targets through combination of different techniques for diagnostic imaging: optical imaging/magnetic resonance imaging (OI/MRI), optical imaging/positron-emission tomography (OI/PET).

18. **Lazarova D.**, A. Popova, D. Stanoeva, M. Velitchkova. Involvement of reactive oxygen radicals in photoinhibition of primary photosynthetic reactions effect of temperature and oxygen radical scavengers, *Biotechnology and Biotechnological Equipment* [SE], 2009, 23, 511-515. IF=0.291

Излагането на листа или хлоропласти на високи светлинни интензитети води до инактивиране на фотосинтезата. Наблюдават се два процеса – инхибиране на фотохимичната активност на двете фотосистеми и фотообезцветяване на пигментите. Кислород-отделящият комплекс (КОС), който е разположен в донорната страна на ФСII, е най-чувствителният компонент на фотосинтетичния апарат (ФСА) към факторите на околната среда. В настоящата работа е изследван ефектът на високите светлинни интензитети при стайна и ниска температура върху кинетичните параметри на светкавичните кислородни добиви и кислородното избухване. Изолирани тилакоидни мембрани са третирани с високи светлинни интензитети за различни периоди от време при стайна (22°C) и ниска (4°C) температура. Кислородните добиви са измерени със скоростен полярографски електрод. Фотохимичната активност на ФСII е регистрирана с Кларков електрод с помощта на екзогенни електронни акцептори.

Представените данни показват, че фотоинхибирането при пробите на 4°C е по-малко, отколкото при тези на 22°C. В присъствието на хистидин и DMSO – гасители на активни кислородни форми (ROS), процесът на инхибиране се забавя. Данните са дискутирани по отношение на различните нива, видове и подвижност на ROS при стайна и ниска температура.

Exposure of leaves or chloroplasts to high light intensity leads to inactivation of photosynthesis. Two processes are observed – inhibition of photochemical activity of both photosystems and photobleaching of pigments. Oxygen evolving complex, located at the oxidizing side of Photosystem II, is the most sensitive component of photosynthetic apparatus to environmental stress factors. In the present work the effect of high light treatment at room and low temperatures on kinetic parameters of flash oxygen yields and oxygen evolution were studied. Isolated thylakoid membranes were subjected to high light illumination for different periods of time at room (22°C) and low (4°C) temperature. Flash oxygen yields were determined using fast oxygen rate electrode. Photochemical activity of photosystem II was measured by Clark oxygen electrode using artificial electron acceptor.

Data presented show that the damaging effect of high light treatment on oxygen evolution is lower at 4°C than at 22°C. When high light treatment was carried out in the presence of histidine and DMSO – scavengers of oxygen radicals, the inhibition process was retarded. Data are discussed in terms of different production rate and mobility of oxygen radicals at room and low temperature.

19. Velitchkova M., S. Abarova, **D. Lazarova**, K. Stoichkova, D. Stanoeva, A. Andreeva. Protective effect of histidine against pigment photobleaching in Photosystem I particles, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 2009, 11(9), 1230-1233. IF=0.433

Фотосистема I (ФСI) е суперкомплекс включващ реакционен център и мембранно-асоцииран антенен светосъбиращ комплекс. Изследвани са частици ФСI, изолирани от листа на спанак с нискотемпературна 77K флуоресценция и Раманова спектроскопия. При продължително излагане на високи светлинни интензитети, различни пигменти от ФСI проявяват различна чувствителност към фоторазрушаване. В тази работа са представени предварителни изследвания върху ефекта на хистидина върху фотообезцветяването на пигменти в изолирани частици ФСI. С Рамановата спектроскопия е получена информация за ефекта на хистидина върху фотообезцветяването на лютеиновите молекули при възбуждане с дължина на вълната на

лазерната линия $\lambda_L=514.5$ nm. Нашите резултати показват, че хистидинът намалява фотообезцветяването на пигментите от антенните комплекси, особено на лютеина, както и на най-дълговълновите хлорофили, разположени във ФСІ суперкомплекс.

Photosystem I (PSI) is a supercomplex of a reaction centre and light-harvesting complexes. Photosystem I particles isolated from spinach leaves were studied by means of absorbance, 77 K fluorescence, and resonance Raman spectroscopy. During prolonged exposure to high-light intensities, various pigments in Photosystem I exhibited different susceptibilities to photobleaching. This work presents preliminary investigations on the effect of histidine on the photobleaching of pigments in isolated particles of photosystem I. Resonance Raman spectroscopy allowed us to obtain direct information about the effect of histidine on the photobleaching of the lutein molecules, upon excitation with a 514.5 nm laser line. Our results showed that histidine reduces the photobleaching of antenna pigments and especially luteins and the most long-wavelength absorbing chlorophylls located in the PSI antenna complex.

20. Velitchkova M., **D. Lazarova**, A. Popova. Response of isolated thylakoid membranes with altered fluidity to short time heat stress, *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2009, 15(1), 43-52. SJR=0.173

Изследвана е термочувствителността на фотосистема I (ФСІ) и фотосистема II (ФСII) при промяна в липидния състав на изолирани тилакоидни мембрани чрез интегрирането на стероли. Растителен стерол стигмастерол и холестерол са включени за намаляване на флуидитета на липидната фаза на изолирани тилакоидни мембрани. След третиране със стерол се регистрира намаляване на температурата на инхибиране на ФСII с 50%. Наблюдава се стимулиране на електронния транспорт през ФСІ при топлинен стрес, но само за контролните проби. За оценка промяната на флуидитета на мембраната върху кислород-отделящия комплекс са регистрирани светкавични кислородни добиви, с помощта на които може да се оцени стехиометрията на ФСII $_{\alpha}$ и ФСII $_{\beta}$ центровете.

Ефектът от включването на стерол върху промените в термотропните характеристики на основните пигмент-белтъчни комплекси е изследван чрез диференциална сканираща калориметрия (ДСК). ДСК профилите на контролни тилакоиди в температурния диапазон 20-98°C се характеризират с няколко необратими ендотермични прехода. Включването на холестерол и стигмастерол води до наслагване на преходите и само два основни пика могат да бъдат разграничени. Докато във високотемпературния диапазон са при една и съща температура, след обработка с двата стерола, пикът, който комбинира преходите в нискотемпературния диапазон, показва различна температура на денатуриране (T_m): 70°C за третиране със стигмастерол и 65°C за третиране с холестерол мембрани. Представените тук данни подчертават важната роля на липидния състав на ТМ в условия на високи температури, която се повлиява не само от промени във флуидитета в резултат на включването на стероли, но и от промени в термотропните характеристики на пигмент-белтъчните комплекси.

The effect of alterations of lipid phase order of thylakoid membranes on the thermosensitivity of photosystem I (PSI) and photosystem II (PSII) was studied. Plant sterols stigmasterol and cholesterol were applied to decrease the fluidity in isolated membranes. After sterol treatment, a decrease of the temperature of 50% inhibition of PSII activity was observed. Heat stress-induced stimulation of PSI-mediated electron transport rate was registered for control, but not for sterol-treated membranes. Effect of altered lipid order on oxygen evolving complex was evaluated by means of flash oxygen yields revealing changes in the stoichiometry of PSII $_{\alpha}$ and PSII $_{\beta}$ centers. The effect of sterol incorporation on the changes in the thermotropic behavior of the main pigment-protein complexes was studied by differential scanning calorimetry (DSC). DSC traces of control thylakoids in the temperature range 20-98°C exhibited several irreversible endothermic transitions. Incorporation of cholesterol and stigmasterol results in superimposition of the transitions and only two main bands could be resolved. While high temperature band peaks at the same temperature after treatment with both sterols, the band that combines low temperature transitions shows different melting temperature (T_m): 70°C for stigmasterol- and 65°C for cholesterol-treated membranes. The

data presented here emphasise the crucial role of lipid order for the response of thylakoids to high temperatures, mediated not only by changes in the fluidity of bulk lipid phase as result of sterol incorporation but also by changes in the thermotropic properties of pigment-protein complexes.

(публикации във връзка с дисертационен труд за придобиване на ОНС “доктор”)

21. **Lazarova D., S. Shibata, I. Ishii, G. Zlateva, Z. Zhelev, I. Aoki, T. Higashi, R. Bakalova.** Nitroxide-enhanced magnetic resonance imaging of kidney dysfunction in vivo, based on redox-imbalance and oxidative stress, *General Physiology and Biophysics*, 2019, 38(3),191-204. IF=1.070

Бъбречната дисфункция е съпроводена с редокс-дисбаланс и развитие на оксидативен стрес в тъканите. В настоящото изследване се съобщава за диагностика на редокс-дисбаланса с използване на mito-TEMPO като редокс-чувствителна контрастна сонда и MRI. Експериментите са осъществени върху три групи мишки: група 1 – отглеждани на нормална диета (ND мишки), група 2 – на холестеролна диета (CD мишки), група 3 – на холестеролна диета плюс антилипидемичния препарат холестирамин (CC мишки). След 15 седмици от започването на съответната диета, мишките са подложени на следните анализи: (1) нива на плазмен холестерол; (2) функционални тестове на бъбреците, включващи тотален белтък, албумин, уреа, серумен креатинин, пикочна киселина; (3) нитроксид-усилен MRI с mito-TEMPO като редокс-сензор за определяне промяната в редокс-статуса на бъбреците *in vivo*; (4) микроскопия на хистологични препарати от бъбреци; (5) определяне на антиоксидантен капацитет и нива на ROS в тъканни хомогенати, с използване на конвенционални тестове *in vitro*. Нитроксид-усилният MRI сигнал след инжектиране на mito-TEMPO в бъбреците се характеризира с: висока интензивност и дълъг живот при CD мишки, което е показател за окислителен капацитет на бъбречните тъкани; слаба интензивност и кратък живот при ND мишки, което показва висок редуциращ капацитет; умерена интензивност и относително кратко време на живот при CC мишките, което показва защитен ефект на препарата, понижаващ нивата на холестерол. Данните бяха потвърдени на изолирани тъканни проби с конвенционални тестове. Предполагат се, че хиперхолестеролемията индуцира редокс-дисбаланс в бъбреците и този процес може да бъде визуализиран с помощта на MRI и mito-TEMPO като редокс-чувствителна контрастна сонда.

This study reports a non-invasive magnetic resonance imaging (MRI) of kidney dysfunction in mice, based on the induction of redox-imbalance and oxidative stress in the renal tissues, using mito-TEMPO as redox-sensitive contrast probe. Kidney dysfunction was triggered by hypercholesterolemia. The mice were divided in three groups: (i) on normal diet (ND); (ii) on cholesterol diet (CD); (iii) on cholesterol plus cholestyramine diet (CC). After 15 weeks feeding, the mice were subjected to the following analyses: plasma cholesterol levels; serum test for renal functionality; nitroxide-enhanced MRI of tissue redox-status *in vivo*; histochemical staining of tissue section to visualize renal damage; evaluation of total antioxidant capacity and oxidative stress on isolated tissue specimens. MRI signal of mito-TEMPO in the kidney was characterized by: high intensity and long life-time in CD mice, indicating a high oxidative capacity of renal tissues; poor intensity and short life-time in ND mice, indicating a high reducing capacity; moderate intensity and relatively short life-time in CC mice, indicating a protective effect of lipid-lowering drug. The data were confirmed on isolated tissue specimens, using conventional tests. They suggest that hypercholesterolemia induces redox-imbalance in kidney and this process could be visualized using MRI and mito-TEMPO as a redox-sensitive contrast.

22. **Lazarova D., S. Shibata, I. Ishii, G. Zlateva, Z. Zhelev, I. Aoki, R. Bakalova.** Imaging of redox-imbalance and oxidative stress in kidney in vivo, induced by dietary cholesterol, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 2019, 33(1), 294–301. IF=1.186

В настоящото изследване е използван хидрофобен нитроксиден радикал, проникващ през клетъчната мембрана – mito-TEMPO, за неинвазивно визуализиране на бъбречна дисфункция при мишки, базирана на редокс-дисбаланс и оксидативен стрес в бъбречните тъкани. Бъбречната дисфункция е предизвикана от хиперхолестеролемия. Експериментите са осъществени върху три групи мишки: група 1 – отглеждани на нормална диета (ND мишки), група 2 – на холестеролна диета (CD мишки), група 3 – на холестеролна диета плюс, антилипидемичния препарат холестирамин (CC мишки). Мишките на холестеролна диета се характеризират със значително повишени нива на тотален холестерол и non-HDL-холестерол в кръвната плазма, както и повишени серумни нива на урея в кръвта, пикочна киселина и креатинин, в сравнение с мишките на нормална диета. При третата група животни – на холестеролна диета и приемащи холестирамин са регистрирани леко повишени плазмени нива на общ холестерол и HDL-холестерол, но не и на non-HDL-холестерол, в сравнение с мишките на нормална диета. Серумните нива на уреята в кръвта, пикочна киселина и креатинин при CC мишки са равни на тези при ND мишки. При групата мишки на холестеролна диета се наблюдава значително повишаване на MRI сигнала след инжектиране на контрастната субстанция и запазване на сигнала, което показва висок окислителен капацитет на бъбречните тъкани; при групата на здравите мишки се регистрира слабо повишаване и бързо изчезване на MRI сигнала, непосредствено след инжектиране на mito-TEMPO, което може да се обясни с високата редуцираща способност на здравите бъбречни тъкани; умерена интензивност и относително кратък живот при третата група животни, което показва защитния ефект на антилипидемичния препарат срещу окислителното увреждане. Данните предполагат, че хиперхолестеролемията предизвиква редокс-дисбаланс и оксидативен стрес в бъбреците и този процес може да бъде визуализиран с помощта на нитроксид-усилен MRI, с използване на mito-TEMPO като редокс-чувствителна контрастна сонда.

We used a mitochondria-penetrating nitroxide, mito-TEMPO, as a contrast probe for imaging of kidney dysfunction in mice, based on the redox-imbalance and oxidative stress in the renal tissues. Kidney dysfunction was triggered by hypercholesterolemia. The mice were divided in three groups: (i) on normal diet (ND; control); (ii) on cholesterol diet (CD); (iii) on cholesterol plus cholestyramine diet (CC). CD mice showed increased plasma levels of total cholesterol and non- HDL-cholesterol, as well as increased serum levels of blood urea nitrogen, uric acid and creatinine, compared to ND mice. CC mice showed slightly increased plasma levels of total cholesterol and HDL-cholesterol, but not non-HDL-cholesterol, compared to ND mice. The serum levels of blood urea nitrogen, uric acid and creatinine in CC mice were equal to those in ND mice. The MRI signal of mito-TEMPO in the kidneys was characterized by: high intensity and long life-time in CD mice, indicating a high oxidative capacity of renal tissues; poor intensity and short lifetime in ND mice, indicating a high reducing capacity of renal tissues; moderate intensity and relatively short life-time in CC mice, which shows the protective effect of lipid-lowering agents against oxidative damage. The data suggest that hypercholesterolemia induces redox-imbalance and oxidative stress in kidneys and this process could be visualized using MRI and mito-TEMPO as a redox-sensitive contrast substance.

23. **Zhelev Z., R. Bakalova, I. Aoki, D. Lazarova, T. Saga.** Imaging of superoxide generation in the dopaminergic area of the brain in Parkinson's disease, using mito-TEMPO, *ASC Chem. Neurosci.*, 2013, 4(11), 1439-1445. IF=4.210

Настоящата статия е посветена на нова методика за визуализиране на продукцията на супероксидни радикали в допаминергичната област на мозъка при болестта на Паркинсон. В основата на метода е редокс-цикълът на нитроксилния дериват мито-TEMPO, който прониква през кръвно-мозъчната бариера, клетъчната и митохондриалната мембрани и се характеризира с T1 контраст за магнитно-резонансна

томография (MRI). Експериментите са проведени върху мишки от линията C56Bl/6, разделени в две групи – здрави и третирани с 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрахиdropиридин (MPTP). При здравите животни нитроксид-усиленият MRI сигнал е сравнително слаб и кратък (време на полуживот ~40 сек.; продължителност ~80 сек.). Профилът на хистограмите показва, че здравите мозъчни тъкани имат висока редуцираща способност по отношение на мито-TEMPO. При MPTP-третираните мишки, нитроксид-усиленият MRI сигнал е силен и продължителен (време на полуживот >20 мин.; продължителност >20 мин.), особено в допаминергичните области на мозъка. Хистограмите показват висока окислителна активност на допаминергичните тъкани на MPTP-третираните мишки. Тези резултати са директно доказателство, върху интактни животни, че супероксидният радикал е главен индуктор и/или медиатор за невродегенеративните увреждания при болестта на Паркинсон. Високият окислителен капацитет на мозъчните тъкани при болестта на Паркинсон е потвърден и с конвенционални тестове на изолирани тъканни препарати за оценка на нивата на ROS/RNS и тотален антиоксидантен капацитет.

We report a new methodology for direct visualization of superoxide production in the dopaminergic area of the brain in Parkinson's disease, based on the redox cycle of mito-TEMPO, a blood-brain barrier-, cell-, and mitochondria-penetrating nitroxide derivative with superoxide scavenging properties and T₁ magnetic resonance imaging (MRI) contrast. The experiments were conducted on healthy and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)- treated mice. In healthy mice, the nitroxide-enhanced MRI signal was weak and short-lived (half-life ~ 40 s; duration ~ 80 s). The profile of the histograms indicated a high reducing activity of normal brain tissues against mito-TEMPO. In MPTP-treated mice, the nitroxide-enhanced MRI signal was strong and long-lived (half-life >20 min; duration >20 min), especially in the dopaminergic area of the brain. The histograms indicated a high oxidative activity in dopaminergic tissues of MPTP-treated mice. The results show directly, on intact mammals, that superoxide is a major inducer and/or mediator of neurodegenerative damage in Parkinson's disease. The high oxidative status of brain tissue in Parkinson's disease was also confirmed on isolated tissue specimens, using total reducing capacity assay and ROS/RNS assay.

24. Ivanova D., R. Bakalova, **D. Lazarova**, V. Gadjeva, Z. Zhelev. The impact of reactive oxygen species on anticancer therapeutic strategies, *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2013, 22(6), 899-908. IF=0.333

Над 50-годишният опит в изучаване на активните форми на кислорода и тяхното отношение към биологията и медицината показва, че нормалните здрави клетки на бозайниците се характеризират с ниско ниво на активните форми на кислорода (ROS) и постоянно (референтно) ниво на редуциращи еквиваленти. Трайното повишаване на ROS над критичното ниво води до постоянен оксидативен стрес в клетките. Това може да причини нестабилност на генома и мутации, които са отговорни за адаптацията на клетките към оксидативен стрес и тяхното оцеляване. На свой ред тези мутации могат да провокират злокачествено заболяване. Общоприето е, че балансът между ROS и редуциращите еквиваленти в клетките и тъканите определя техния редокс-статус. Оценката на редокс-статуса на тъканите има голям потенциал при диагностиката на онкологични заболявания, както и перспективи при антираковата терапия и би могла значително да допринесе за планирането на подходящо лечение и за повишаване качеството на живот на пациентите. Конвенционалната терапевтична стратегия се основава на лекарства, които увеличават генерирането на ROS и индуцират апоптоза в раковите клетки. Този терапевтичен подход обаче, има сериозни недостатъци, който се изразява в проявата на различни странични ефекти в нормални (неракови) тъкани. Настоящият обзор описва основите на биологията на свободните радикали в канцерогенезата. Авторите акцентират върху различния редокс-статус, с който се характеризират нормалните и раковите клетки, което позволява използването на този показател като нов терапевтичен таргет. Авторите, също така очертават някои насоки за разработването на обещаващи терапевтични стратегии, на база на регулацията на редокс-сигнализицията с помощта на комбинирана терапия. Обзорът е предназначен за широка читателска аудитория – от неспециалисти до изследователи в областта на биохимията на онкологичните заболявания и фармацията.

Over 50 years of experience in free radical biology and medicine shows that normal cells of healthy mammals are characterized by a low steady-state level of reactive oxygen species (ROS) and a constant (reference) level of reducing equivalents. A lasting increase of ROS above the critical level leads to permanent oxidative stress in the cells. This could cause genomic instability and mutations, which are responsible for adaptation of cells to oxidative stress and their survival in an oxidative environment. In turn, these events could provoke malignancy. It is widely accepted that the balance between ROS and reducing equivalents in cells and tissues determines their redox status. The evaluation of tissue redox status has great diagnostic potential in cancer, as well as prognostic potential for cancer therapy, and could significantly contribute to the planning of appropriate treatment and to increasing the patients' quality of life. The conventional therapeutic strategy is based on drugs that increase ROS generation and induce apoptosis in cancer cells. However, this therapeutic approach has serious disadvantages: the expression of various toxic side effects in normal (non-cancer) tissues. The current review describes the basics of free radical biology in carcinogenesis. The authors emphasize the different redox status of normal and cancer cells, which permits the use of this parameter as a new therapeutic target. The authors also outline some directions for the development of promising therapeutic strategies based on the regulation of redox signaling using combined therapy. The review is intended for a broad readership – from non-specialists to researchers in the field of cancer biochemistry and pharmacy.

II. Публикации в нерепубликани списания с научно рецензиране.

(публикации *извън* дисертационен труд за придобиване на ОНС “доктор”)

25. Хаджидеков Г., Д. Лазарова, П. Гецов, Г. Златева, Р. Бакалова, Л. Спасов
Експериментален модел за регистриране на тъканния редокс-статус в допаминергичната област на мозъка с магнитно-резонансна томография, Годишник на Софийския университет “Св. Климент Охридски“, Медицински факултет, 2015, 1, 174-185.

Настоящата статия е посветена на нова методика за визуализиране на продукцията на супероксидни радикали в допаминергичната област на мозъка при болестта на Паркинсон. В основата на метода е редокс-цикълът на нитроксилния дериват mito-TEMPO, който прониква през кръвно-мозъчната бариера, клетъчната и митохондриалната мембрани и се характеризира с MRI T₁ контраст. Експериментите са проведени върху мишки от линията C56Bl/6, разделени в две групи – здрави и третирани с 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрахидропиридин (MPTP). При здравите животни нитроксид-усиленият MRI сигнал е сравнително слаб и кратък (време на полуживот ~40 сек.; продължителност ~80 сек.). Профилът на хистограмите показва, че здравите мозъчни тъкани имат висока редуцираща способност по отношение на mito-TEMPO. При MPTP-третираните мишки, нитроксид-усиленият MRI сигнал е силен и продължителен (време на полуживот >20 мин.; продължителност >20 мин.), особено в допаминергичните области на мозъка. Хистограмите показват висока окислителна активност на допаминергичните тъкани на MPTP-третираните мишки. Тези резултати са директно доказателство, върху интактни животни, че супероксидният радикал е главен индуктор и/или медиатор за невродегенеративните увреждания при болестта на Паркинсон.

We report a new methodology for direct visualization of superoxide production in the dopaminergic area of the brain in Parkinson's disease, based on redox cycle of mito-TEMPO – a blood-brain barrier-, cell-, and mitochondria-penetrating nitroxide derivative with superoxide scavenging properties and T1 magnetic resonance imaging (MRI) contrast. The experiments were conducted on healthy and 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mice. In healthy mice, the nitroxide-enhanced MRI signal was weak and short-lived (half-life ~40 sec; duration ~80 sec). The profile of the histograms indicated a high reducing activity of normal brain tissues against mito-TEMPO. In MPTP-treated mice, the nitroxide-enhanced MRI signal was strong and long-lived (half-life >20 min; duration >20 min), especially in the dopaminergic area of the brain. The histograms indicated a high oxidative activity in dopaminergic tissues of MPTP-treated mice. The results approve directly, on intact mammals, that superoxide is a major inducer and/or mediator of neurodegenerative damage in Parkinson's disease.

26. Mihailova G., M. Velitchkova, V. Doltchinkova, D. Lazarova, K. Georgieva.
Photosynthetic characteristics of the resurrection plant *Haberlea Rhodopensis* from two habitats, *Genetics and Plant Physiology*, 2015, 5(1), 74–85.

Изследвани са фотосинтетичните характеристики на растението *Haberlea rhodopensis* от две местообитания в Западните Родопи (в районите на Триград и Чудните мостове). Въпреки че, растенията от двете местообитания са били изложени на слънце през част от деня, листата им са били морфологично подобни на тези на сенчестите растения. При засушаване се индуцират увреждания на целостта на мембраната, които се характеризират с изтичане на електролити и липидна пероксидация.

Фотохимичната активност, разпределението на енергията между двете фотосистеми и физикохимичните свойства на тилакоидните мембрани са оценени чрез измервания на хлорофилна флуоресценция, 77K флуоресценция и микроелектрофореза. Организацията на комплексите ФСІ-ССКІ и ФСІІ-ССКІІ и разпределението на енергията между тях са сходни при тилакоидите, изолирани от напълно хидратирани растения от двете местообитания – Триград и Чудните мостове. При засушаване до 8% RWC

съотношението F735/F685, при възбуждане с 472 nm (chl *b*), остава почти непроменено в тилакоидните мембрани от Чудните мостове, докато значително намалява в тилакоидните мембрани от Триград. Тилакоидните мембрани от Чудните мостове показват по-малко промени в разпределението на енергията между двете фотосистеми в отговор на дехидратацията. Индуцираните от дехидратацията модификации (изтичане на електролити, липидна пероксидация и плътност на повърхностния заряд на мембраната) в тилакоидните мембрани на растенията от Триград са по-силно изразени.

The photosynthetic characteristics of *Haberlea rhodopensis* plants from two habitats in Western Rhodope Mountain (in the regions of Trigrad and Wonderful bridges) were studied. Although the plants from both habitats were exposed to sun during part of the day, their leaves were morphologically similar to those of shade plants. The desiccation-induced damages on membrane integrity were characterized by electrolyte leakage and lipid peroxidation.

Photochemical activity, energy distribution between the two photosystems and physicochemical properties of thylakoid membranes were estimated by means of chlorophyll fluorescence, 77K fluorescence and particle microelectrophoresis measurements. The mutual organization of PSI-LHCI and PSII-LHCII complexes and spillover between them were similar in thylakoids isolated from well-hydrated plants from Trigrad and Wonderful bridges. Under desiccation up to 8% RWC the F735/F685 ratio at excitation with 472 nm (chl *b*) remained almost unchanged in thylakoid membranes from Wonderful bridges while it decreased considerably in thylakoid membranes from Trigrad. The thylakoid membranes from Wonderful bridges showed a less alteration in energy distribution between both photosystems in response to dehydration. Dehydration induced stronger modifications in thylakoid membranes of plants from Trigrad, expressed by higher electrolyte leakage, lipid peroxidation and membrane surface charge density.

27. Tsankova E., **D. Lazarova**, A. Tsanova, Ts. Marinova, P. Jotovskii, Iv. Minkov, G. Zlateva. Application of innovation methods at foreign students in medicine for optimization of learning process in pre-clinical education, *Trakia Journal of Sciences*, 2010, 8, Suppl. 3, 373-375.

ЦЕЛ: Целта на това изследване е да проследи необходимостта от създаване на терминологичен справочник на български и английски език, включително термини и фрази, често срещани в специализираната литература. Тези термини и фрази трябва да бъдат обяснени лесно, по изчерпателен начин, без да се намаляват тяхната научна стойност, в част от изучаваните доклинични дисциплини: Биология на човека, Цитология и Хистология, Физика, Биофизика, Химия, Биохимия и Анатомия на човека.

МЕТОДИ: Проведено е анонимно проучване сред чуждестранни студенти, относно необходимостта от създаване на терминологичен справочник на български и английски език и предпочитано оформление на образователен наръчник.

РЕЗУЛТАТИ: Повечето от студентите одобряват идеята за създаване на такъв наръчник, намирайки го за полезен при усвояване на знанията по предклиничните дисциплини.

ЗАКЛЮЧЕНИЯ: Въз основа на анализа на педагогическия експеримент, може да се заключи, че резултатите от анкетите напълно съответстват на прякото наблюдение на преподавателите по различните дисциплини и затвърждават мнението им, относно необходимостта от създаване на такъв наръчник и прилагане на допълнителни форми на обучение.

PURPOSE: Purpose of this study is to follow the necessity of creation of terminological reference book in Bulgarian and English language, including terms and phrases, common in the specialized literature. These terms and phrases have to be explained easily in comprehensive way, without reducing their scientific value, in part of the studied pre-clinical disciplines: human biology, cytology and histology, physics and biophysics, chemistry and biochemistry, and human anatomy.

METHODS: Anonymous inquiry was conducted among foreign students, regarding necessity of creation of terminological reference book in Bulgarian and English language and preferred design of educative handbook.

RESULTS: Most of the students approve the idea of creating such handbook, finding it useful in assimilation of knowledge in pre-clinical disciplines.

CONCLUSIONS: Based on the analysis of the pedagogical experiment, it could be concluded that inquiry results completely match the direct observation of lecturers in different disciplines and strengthen their opinion regarding the need of creating such handbook and implementation of additional forms of education.

28. Лазарова Д., В. Гетов, М. Гурманова, Р. Бакалова, Р. Страсер, В. Голцев. Оценка състоянието на фотосинтетичния апарат след третиране с инхибитори на електронния транспорт, Proceedings of the 20th Anniversary International Scientific Conference – Natural & Mathematical science, Stara Zagora, 2010, 4, 1-6.

Целта на представената работа е да се диагностицира състоянието на електрон-транспортните вериги *in vivo* на растения, подложени на действие на инхибитори на електронния транспорт.

За анализ на индукционните преходи на хлорофилната флуоресценция е използван флуориметър M-PEA (Multifunctional Plant Efficiency Analyzer), който е прототип, уникален по рода си, позволяващ на неоткъснат лист от цяло растение да се измерват индукционни кинетики на бързата и забавената хлорофилна флуоресценция и по модулираното светоразсейване при 820 nm да се охарактеризират различни участъци на фотосинтетичната електрон-транспортната верига, в частност на P700. Резултатите дават възможност за качествена оценка на промените в ФСА *in vivo*, в растения, третирани с хербициди. Регистрират се едновременни изменения в различни компоненти на фотосинтетичната верига, което ни позволява прецизно да анализираме влиянието на приложените екзогенни химични агенти.

Main purpose of this paper is to diagnose the condition of electron-transport chains of plants *in vivo*, exposed to inhibitors of electron transport.

For analyses of induction transitions of chlorophyll fluorescence is used fluorimeter M-PEA (Multifunctional Plant Efficiency Analyzer), which is an unique prototype, allowing on not cut-off leaf to be measured induction kinetics of fast and delayed chlorophyll fluorescence and by modulated light reflection at 820 nm to be characterized different parts of photosynthetic electron-transport chain, particularly P700. Results provide opportunity for quality evaluation of changes in PSA *in vivo*, in plants treated with herbicides. Simultaneous changes in different components of photosynthetic chain are registered, which allow us precise analyses of influence of applied exogenous chemical agents.

29. Лазарова Д., М. Гурманова, Д. Джилянв, В. Голцев. Използване на луминесцентните характеристики на ФС2 за оценка динамиката на водния стрес при растения, Proceedings of the International Science Conference "Economics and Society development on the Base of Knowledge – Medical Biology Studies", Stara Zagora, 2009, 3, 72-77.

Ниската влажност е един от основните фактори на средата, ограничаващи растежа и развитието на растението. При достигане на критични стойности на листен воден дефицит, фотосинтетичният капацитет на повечето С3 растения се понижава. Луминесцентните методи, които са недеструктивни и високо чувствителни по своята същност, са подходящи за проследяване реакциите на изследваните обекти *in vivo* в условия на силен стрес. Възможност за оценка на функционалното състояние на ФСII в условия на воден стрес е проследяването на хлорофилната вариабилна флуоресценция - високочувствителен и информативен метод, позволяващ да се получи богата информация за различни характеристики на ФСА в *in vivo* условия.

Интерес представлява динамиката на прехода от нормално овлажнено състояние към засушено, при растения с различно (моделно) поведение по отношение на засушаването – от една страна са нетолерантните към воден стрес (*Plectranthus* sp. и *Chirita* sp.), а от друга – две групи толерантни – хомеохлорофилни (HDT),

Haberlea rhodopensis и пойкилохлорофилни (PDT), *Craterostigma plantagineum*. Въз основа на получените резултати може да се каже, че в групата на нетолерантните растения до около 40% дехидратация, недостигът на вода, не води до промени на фотосинтетичните характеристики. Между 40% и 80% има пропорционално намаляване на фотосинтетичната активност по всички изследвани параметри, наблюдава се инактивация на ФСII, засягаща броя на активните РЦ, улавянето на енергия и нейния пренос към РЦ. В този интервал вероятно още няма промени на химичния състав на ФСА – антенните комплекси все още не са деградирани, но може би са конформационно изменени. При воден дефицит над 80% рязко намаляват всички параметри, което е съпроводено с изменение на антенните комплекси, броя на активните РЦ и първичната фотохимична реакция, т.е. при растения еволюционно неприспособени към възстановяване, стресовото увреждане на ФСА настъпва много по-бавно, но необратимо. При анализ на резултатите, отчетени при толерантни към воден стрес растения се забелязва, че ФСА реагира остро едва при достигане на критични стойности на воден дефицит. След продължителен период на неполиване се наблюдава рязък преход в рамките на едно денонощие от нативен ФСА, немодифициран от водния дефицит, към изцяло инактивиран. Същото се проследява при рехидратиране на растението. Именно от проследяване на динамиката проличава реакцията на трите вида растения изследвани *in vivo*.

В заключение може да се каже, че получените луминесцентни параметри са достатъчно информативни и тяхното използване за оценка на воден стрес в *in vivo* системи, намира приложение.

Low humidity is one of the basic environmental factors, limiting plant growth. Reaching critical values of water deficit, photosynthetic capacity of most C3 plants is reduced. Luminescent methods, which are non-destructive and high sensitive, are proper for evaluation the reactions of plants *in vivo* under water stress. Chlorophyll variable fluorescence (that is high-sensitive and informative method for *in vivo* analysis of photosynthetic machinery), provides an opportunity for rating functional status of Photosystem II (PSII) under water stress.

Transitional dynamics from watered to dry state in plants with different (model) behavior towards desiccation was investigated in desiccation-sensitive (*Plectranthus* sp. and *Chirita* sp.) and homoiochlorophyllous desiccation-tolerant (HDT) *Haberlea rhodopensis* and poikilochlorophyllous desiccation-tolerant (PDT) *Craterostigma plantagineum*. Our results indicate that in desiccation-sensitive plants water deficit about 40% do not affect photosynthesis (PS). During drying of the plants up to 40% – 80% PS activity decrease proportionally in all measured parameters and results in inactivation in PSII, expressed in reducing of number of active reaction centers. Water deficit over 80% leads to sharp decrease of all parameters, which is related to modification in antenna complexes and irreversible damages. In desiccation-tolerant plants, the changes in PS are visible when water deficit reaches critical values, and after rehydration, complete recovery of PS is registered.

We can conclude that luminescent parameters are informative and their application for evaluation of water stress *in vivo* is proper.

(публикации във връзка с дисертационен труд за придобиване на ОНС “доктор”)

30. Бакалова Р., Д. Лазарова, Г. Златева, Ж. Желев, Л. Спасов, И. Аоки. Визуализация и свръхпродукция на супероксидни радикали в живи клетки и нидроксиди, усилващи магнитнорезонансни изображения – нов поглед в молекулярните механизми на функционалния MRI, Годишник на Софийски университет “Св. Климент Охридски“, Медицински факултет, 2017, 2, 123-134.

В настоящата статия са представени резултати за ролята на супероксидния радикал в усилване на контраста в T₁- магнитно-резонансни изображения (MRI) на живи клетки и моделни системи – в присъствие и отсъствие на нидроксиди (контрастни вещества), като резултат от намаляване на релаксационното време T₁.

Свръхпродукцията на супероксидни радикали в живи клетки беше индуцирана чрез третиране с

ротенон (инхибитор на Комплекс I на митохондриалната дихателна верига) и 2-метокси естрадиол (инхибитор на супероксид дисмутаза)(2-ME/Rot). МРІ изследванията бяха проведени на 7Т МРІ апарат (на фантоми). Свърхпродукцията на супероксид в 2-ME/Rot-третираните клетки беше потвърдена чрез конвенционален дихидроетидиев тест. В присъствие на нитроксидни сонди (mito-TEMPO), интензитетът на МРІ-сигнала в 2-ME/Rot-третираните клетки беше ~30-40% по-висок, в сравнение с този в нетретираните клетки или клетъчни култури. В моделни системи (без клетки) беше установено, че супероксидът, но не и водородният пероксид, повишава интензитета на T₁-контрастния МРІ сигнал на mito-TEMPO. Освен това супероксидът възстановява МРІ контраста в T₁-изображение на mito-TEMPOH – неконтрастен (диамагнитен) аналог на mito-TEMPO.

Резултатите от тази работа откриват отделно направление за изследване на нови възможности във функционалния МРІ – детектиране на метаболитна активност при свърхпродукция на супероксид, както и при нарушения на баланса между супероксида и водородния пероксид – един много важен механизъм при изясняване на фините молекулни механизми за регулация при много патологични процеси (напр. канцерогенеза, невродегенерация, атеросклероза, възпаления и др.). Визуализацията на митохондриалната активност в реално време може да бъде решаваща за изясняване на молекулните механизми при функционалния МРІ в неговата най-широко приета дефиниция – метод за изследване на връзката между церебралния кръвен ток и нервната активност.

Here we report that superoxide radical is involved in the enhancement of T₁-weighted magnetic resonance imaging (MRI) contrast in living cells and model systems – in the absence and presence of nitroxides as contrast substances, due to the effect of T₁ shortening.

An overproduction of superoxide in living cells was induced by treatment with rotenone (an inhibitor of Complex-I of the mitochondrial respiratory chain) and 2-methoxyestradiol (an inhibitor of superoxide dismutase)(2-ME/Rot). The MRI measurements were performed on 7T MRI (on phantoms). The overproduction of superoxide in 2-ME/Rot-treated cells was confirmed by a conventional dihydroethidium-test. In the presence of nitroxide probe (mito-TEMPO), the intensity of MRI signal in 2-ME/Rot-treated cells was ~30-40% higher, in comparison with that in non-treated cells or culture media. In model (cell-free) systems, we observed that superoxide, but not hydrogen peroxide, increased the intensity of T₁-weighted MRI signal of mito-TEMPO. Moreover, the superoxide restored the T₁-weighted MRI contrast of mito-TEMPOH – a non-contrast (diamagnetic) analogue of mito-TEMPO.

This report gives a direction for discovering new opportunities for functional MRI – for detection of metabolic activity, accompanied by overproduction of superoxide, as well as by disturbance of the balance between superoxide and hydrogen peroxide – a very important approach to clarify the fine molecular mechanisms in the regulation of a lot of pathologies (e.g., carcinogenesis, neurodegeneration, atherosclerosis, inflammation, etc.). The visualization of mitochondrial activity in real-time can be crucial to clarify the molecular mechanism of the functional MRI in its commonly accepted definition – as a method for detection of neurovascular coupling.

31. Ivanova D., E. Georgieva, **D. Lazarova**, V. Gadjeva, R. Bakalova, Z. Zhelev. Redox-modulating and/or antioxidant properties of nitroxides – a potential reason for decreasing side-effects of cancer therapy, *Trakia Journal of Sciences*, 2014, 12(3), 329-337.

Съществуващите терапевтични подходи – лъчетерапията и конвенционалната химиотерапия при онкологични заболявания, имат сериозни странични ефекти, в резултат на повишеното образуване на активни форми на кислорода и азота (ROS/RNS) в нераковите клетки и тъкани. Развитието на оксидативен стрес в нераковите тъкани е сериозен проблем при терапията на онкологични заболявания. Необходимо е да се проучи въпросът за комбинация от вещества с диференциран и синергичен ефект върху раковите и нормалните клетки: вещества с понижаващи нивата на ROS/RNS, насочени към нормални клетки и вещества, повишаващи нивата на ROS/RNS в раковите клетки. В този контекст редокс-модуляторите са едни от най-подходящите претенденти. Настоящият обзор очертава основния принцип на тази нова терапевтична стратегия, като се фокусира върху нитроксидните производни, като едни от най-обещаващите редокс-модулатори с антиоксидантна способност.

The existing therapeutic approaches – radiation therapy and conventional chemotherapy of cancer, suffer of serious side-effects as a result of increased generation of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) in non-cancer cells and tissues. Currently, the development of oxidative stress in non-cancer tissues of cancer-bearing organism is a serious problem of cancer therapy. It is necessary to ask about a combination of substances expressing a therapeutic synergism as a result of differentiated effects on cancer and normal cells: substances with increased ROS/RNS-scavenging properties, targeting normal cells and substances with increased ROS/RNS-generating properties targeting cancer cells. In this context, the redox-modulators are one of the most attractive candidates. The present review outlines the basic principle of this novel therapeutic strategy, focusing on nitroxide derivatives as one of the most promising redox-modulators with antioxidant ability.