

**Резюмета**  
**на избрани публикации на доц. Иванка Цаковска,**  
**в конкурса за заемане на академичната длъжност „Професор“**

1. Dallavalle S, Dobričić V, Lazzarato L, Gazzano E, Machuqueiro M, Pajeva I, **Tsakovska I**, Zidar N; Roberta Fruttero (2020) Improvement of conventional anti-cancer drugs as new tools against multidrug resistant tumors, Drug Resistance Updates, 50, 100682.

Множествената лекарствена резистентност (MDR) е основна причина за неуспеха на химиотерапията при лечение на малигнени тумори. Дизайнът на противотуморни лекарства, които са в състояние да преодолеят MDR, претърпява бързо развитие, показвайки, че тази област на биомедицински изследвания привлича голям интерес в научната общност. Настоящият обзор изследва обещаващи модерни подходи, разработени с цел избягване или преодоляване на MDR. Постигнати са окуражаващи резултати при изследването на MDR-модулиращите свойства на различни класове природни съединения и техните аналози. Инхибирането на P-гр или понижаването на неговата експресия се оказаха основните механизми, чрез които MDR може да бъде преодоляна. Използването на хибридни молекули, които са в състояние едновременно да взаимодействат с два или повече прицелни обекти в ракови клетки, в момента се изследва като средство за преодоляване на лекарствената резистентност. Тази стратегия се основава на дизайна на хибридни съединения, които се получават или чрез обединяване на структурните характеристики на отделни лекарства, или чрез конюгиране на две лекарства или фармакофори чрез разцепващи се/неразцепващи се линкери. Подходът е много обещаващ поради фармакокинетичните и фармакодинамичните предимства, които могат да бъдат постигнати в сравнение с независимото приложение на двата отделни компонента. Трябва обаче да се подчертае, че задачата за получаване на успешни мултивалентни лекарства е много предизвикателна. Наскоро бе разработена конюгацията на противоракови агенти с донори на азотен оксид (NO), което създава особен клас хибриди в борбата с туморната резистентност. Доказано е, че подходящи донори на NO преодоляват лекарствената резистентност чрез нитриране на ABC транспортери и чрез интерфериране с редица метаболитни ензими и сигнални пътища. Показано е, че хибридните съединения, които се получават чрез ковалентно свързване на NO-донори и противотуморни лекарства, предизвикват синергичен цитотоксичен ефект при различни резистентни туморни клетъчни линии. Друга стратегия за преодоляване на MDR се основава на транспортиране с нано-носители и контролирано освобождаване на химиотерапевтични лекарства и P-гр инхибитори. Тяхната фармакокинетика се управлява от наночастиците или полимерния носител и се използва ефектът на засиленото проникване и задържане (EPR), което може да увеличи селективното им доставяне до раковите клетки. Тези системи обикновено се интернализират от туморни клетки чрез ендоцитоза и се натрупват в ендозоми и лизозоми, като по този начин предотвратяват бързия ефлукс. В статията са дискутирани и други подходи за преодоляване на MDR, включително фармакомодулацията на акридин, който е добре известен скафолд в разработването на биоактивни съединения, използването на природни съединения като средства за преодоляване на MDR и конюгирането на противоракови лекарства с носители, таргетиращи специфични клетъчни компоненти. Обзорът дискутира също така изключителния потенциал на методите, използващи *in silico* структура-базирани подходи, като средство за оценка на способността на противотуморни лекарства да взаимодействат с лекарствени транспортери. Структура-базираните методи, които използват 3D структурни данни за протеини и техните комплекси с лиганди, са сред най-ефективните *in silico* методи, тъй като предсказват взаимодействието между транспортните протеини и техните субстрати и инхибитори. Наскоро получената рентгенова структура на човешки P-гр може да помогне за прогнозиране на местата на взаимодействие на разработваните съединения, като предоставя знание за техния начин на свързване и насочва към възможни рационални модификации, за да се предотврати превръщането им в лекарствени субстрати на P-гр. Като обобщение, въпреки че бяха положени големи усилия в търсенето на нови

средства за борба с лекарствено резистентните тумори, те изискват по-нататъшно методологично научно развитие. По-нататъшните изследвания и прогресът в гореспоменатите стратегии ще осигурят значителен напредък в рационалната борба с MDR в противотуморната терапия.

-----  
**2. Tsakovska I**, Alov P, Ikonov N, Atanassova V, Vassilev P, Roeva O, Jereva D, Atanassov K, Pajeva I, Pencheva T InterCriteria Analysis Implementation for Exploration of the Performance of Various Docking Scoring Functions. Studies in Computational Intelligence, приета за печат.

Настоящото изследване е съсредоточено върху прилагането на Интеркритериалния анализ (InterCriteria Analysis, ICrA) в областта на компютърно-подпомогнатия лекарствен дизайн и изчислителната токсикология. ICrA се стреми да надхвърли естеството на критериите, включени в процеса на оценка на множество обекти спрямо множество критерии, и по този начин да открие някои зависимости между самите критерии. Подходът се основава на апарата на индексирания матрици и интуиционистки размитите множества. В това изследване са представени нови софтуерни възможности, внедрени с цел прилагане на ICrA в *in silico* лекарствения дизайн. В изследването ICrA се прилага, за да се проучи ефективността на различни оценъчни функции при докинг. Докингът, който е най-често използваният *in silico* структурен метод в рационалния лекарствен дизайн, се прилага за предсказване на начина на свързване и за оценка на афинитета на свързване на лиганда към протеина. По-специално, лигандите на ядрения пероксизомен пролифератор-активиран рецептор гама (PPAR $\gamma$ ), участващи в контрола на редица физиологично значими процеси, са изследвани за предсказване на свързването им с протеина. В изследването е използвана група от 160 тирозинови PPAR $\gamma$  агонисти с експериментално определени афинитети на свързване. Приложен е докинг в комбинация с разработения от групата фармакофорен модел като филтър. В платформата за молекулно моделиране MOE (v. 2019.01) са тествани различни оценъчни функции и докинг протоколи. ICrA е приложен за оценка на зависимостите между оценъчните функции. Анализът показва висок положителен консонанс на две от оценъчните функции - London dG и Alpha HB. Нито една от функциите не е оценена като добър предиктор на афинитета на свързване.

-----  
**3. Diukendjieva A**, Zaharieva M, Mori M, Alov P, **Tsakovska I**, Pencheva T, Najdenski H, Křen V, Felici C, Bufalieri F, Di Marcotullio L, Botta B, Botta M, Pajeva I (2020) Dual SMO/BRAF Inhibition by Flavonolignans from *Silybum marianum*, Antioxidants, 9(5), 384.

Силимаринът е стандартизиран екстракт от плодовете на *Silybum marianum* (L.) Gaertn. - добре познат хепатопротектор и антиоксидант. През последните години, научните изследвания показват, че биоактивните съединения на силимарина, т.е. силибините и техните 2,3-дехидро производни, проявяват противотуморна активност, но механизмите на тази активност все още не са изяснени. Това изследване комбинира *in silico* и *in vitro* подходи за разкриване на потенциалните взаимодействия на енантиомери на силибини и дехидросилибини с нови протеинови мишени. *In silico* изследването включва оценка на подобие във формата и химическата структура с одобрени лекарства, както и потенциала за взаимодействие с Hedgehog pathway рецептора Smoothened (SMO) и BRAF киназата, който беше потвърден чрез молекулен докинг. *In vitro* изследвания върху SMO и BRAF V600E киназната активност, както и в човешка меланомна клетъчна линия BRAF V600E A-375 бяха проведени допълнително, за да се проучи ефектът на изследваните биоактивни съединения върху тези протеини и туморни клетъчни линии и да се сравнят с *in silico* резултатите. Получените резултати от *in silico* изследването насочват към нови потенциални прицелни протеини за силимариновите компоненти като дуални инхибитори на BRAF и SMO, два основни таргета в противораковата терапия. Експерименталните изследвания потвърждават, че BRAF киназата и SMO участват в механизми на противоракова активност, демонстриращи доза-зависими профили, като дехидросилибините показват по-силен ефект от силибините. Резултатите от това изследване очертават дуалния SMO / BRAF ефект на флавонолигнани от *Silybum marianum* с потенциално клинично значение. Нашият подход може да

бъде приложен и към други природни продукти, за да се разкрият техните потенциални таргети и механизъм на действие.

-----

4. Kochev N, Jeliaskova N, **Tsakovska I** (2020) Cheminformatics representation of chemical structures – a milestone for successful big data modelling. In *Big Data in Predictive Toxicology*, pages 69-107, Royal Society of Chemistry, doi: 10.1039/9781782623656-00069.

В полето на изчислителната токсикология представянето на химическата структура се счита ключово за предсказване/извличане на информация за токсичност на веществата. Хемоинформатиката предоставя ефективни инструменти за изчислителна обработка на химическата информация. Това е още по-важно в ерата на големите масиви от данни, където е налице нарастващ обем информация за наличните химични съединения, налице е също стремеж да се свърже информацията за активността със структурата на химикалите, представени в различни бази данни, както и необходимостта от недвусмислено идентифициране на химически структури и отчитане на структурните характеристики за целите на моделирането. Тази глава прави анализ на различните аспекти на представяне на химическата структура, използвани в хемоинформатиката. Представени са различни подходи за формализиране на химическа информация, заедно с различните нива на структурно представяне, започвайки от 0D (0 измерение) и стигайки до по-сложните 3D и 4D като съществени за взаимодействията с биомакромолекули. Въведени са структурни дескриптори, които представляват химическата структура при моделирането на биоактивността. Освен това се обсъждат предизвикателствата при представяне на уникални структури, представяне на химически субстанции, както и специфични въпроси, свързани с представяне на ароматността и тавтомерията. Подходите показват как да се представи структурната информация в софтуерни химически приложения в контекста на съхраняване / търсене на структурни данни в големи бази данни и използването им за целите на моделиране.

-----

5. Diukendjieva A, Alov P, **Tsakovska I**, Pencheva T, Richarz A, Kren V, Cronin M, Pajeva I (2019), *In vitro* and *in silico* studies of the membrane permeability of natural flavonoids from *Silybum marianum* (L.) Gaertn. and their derivatives, *Phytomedicine*, 53, 79.

Текущо състояние на изследванията: През последните години броят на природните продукти, използвани като лекарства, компоненти на хранителни добавки и козметика, се увеличи значително, което изисква по-задълбочена оценка на техните фармакокинетични свойства.

Цел: Това проучване има за цел да комбинира *in vitro* и *in silico* методи за оценка на гастроинтестинална абсорбция (GIA) на природни флавонолигнани от бял трън (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) и техни производни.

Методи: PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay) моделно тестване е използвано за оценка на клетъчния пермеабилитет на основните компоненти на растението. Набор от 269 съединения с измерени стойности на PAMPA и специализирани софтуерни инструменти за изчисляване на молекулни дескриптори бяха използвани за разработване на QSAR модел за предсказване на PAMPA пермеабилитета.

Резултати: Измерени са стойностите на PAMPA пермеабилитета на 7 съединения, представляващи основни компоненти на белия трън, и е оценена тяхната GIA. Свободно достъпен и лесен за ползване QSAR модел, предсказващ PAMPA пермеабилитет на базата на изчислени физико-химични молекулни дескриптори беше изведен и валидиран върху набор от данни за 783 съединения с известна GIA, неучастващи в построяването на модела. Предсказаните стойности на пермеабилитета корелират добре с получените *in vitro* резултати. QSAR моделът беше допълнително приложен за прогнозиране на GIA на 31 флавонолигнани, които нямат експериментално измерени стойности на GIA.

Изводи: Съгласно *in vitro* и *in silico* резултатите повечето флавонолигнани имат висок пермеабилитет в стомашно-чревния тракт, което е предпоставка за достатъчна бионаличност и потенциал за използването им като водещи структури при разработването на лекарства. Комбинираният подход *in vitro* / *in silico* може да се използва за предварителна оценка на GIA и за направляване на по-нататъшни лабораторни експерименти за фармакокинетично охарактеризиране на биоактивни съединения, включително природни продукти.

---

6. Dinić J, Podolski-Renić A, Jovanović M, Musso L, **Tsakovska I**, Pajeva I, Dallavalle S, Pešić M. (2019) Novel Heat Shock Protein 90 Inhibitors Suppress P-Glycoprotein Activity and Overcome Multidrug Resistance in Cancer Cells, *Int J Mol Sci*, 20, 4575.

Шаперонът Heat Shock Protein 90 (Hsp90) взаимодейства с широк спектър от протеини, участващи в онкогенезата и прогресирането на малигнените тумори. Независимо от това, обаче, Hsp90 инхибиторите до този момент не са успешни като противоракови агенти поради високата си токсичност, липсата на селективност спрямо туморните клетки и ефикаса от мембранни транспортери, отговорни за множествената лекарствена резистентност (MDR) при тумори, като например Р-гликопротеин (P-gr). Установяването на потенциала на нови съединения да инхибират P-gr функцията и / или експресията е от съществено значение при търсенето на ефективни противотуморни лекарства. Единадесет Hsp90 инхибитори, съдържащи изоксазолонфтохинонов скелетон, бяха синтезирани и оценени в два MDR модела, състоящи се от чувствителни и съответни резистентни туморни клетки със свръхекспресия на P-gr (човешки недребноклетъчен белодробен карцином и колоректален аденокарцином). В настоящата работа изследвахме ефекта на Hsp90 инхибиторите върху инхибирането на клетъчния растеж, P-gr активността и P-gr експресията. Беше направен анализ на връзката структура-активност по отношение на клетъчния растеж и инхибирането на P-gr. Съединения 5, 7 и 9 директно взаимодействат с P-gr и инхибират неговата АТФ-активност. Потенциалното им място на свързване в P-gr беше идентифицирано с използването на молекулен докинг. В допълнение, тези съединения понижават експресията на P-gr в клетките на MDR-колоректален карцином, показват добра относителна селективност към раковите клетки, като съединението 5 преодолява резистентността към доксорубин и паклитаксел по концентрационно-зависим начин. Следователно, съединения 5, 7 и 9 могат да бъдат перспективни кандидати за лечение на малигнени тумори със свръхекспресия на P-gr.

---

7. Al Sharif M, **Tsakovska I**, Pajeva I, Alov P, Fioravanzo E, Bassan A, Kovarich S, Yang C, Mostrag-Szlichtyng A, Vitcheva V, Worth AP, Richarz AN, Cronin MTD (2017) The application of molecular modelling in the safety assessment of chemicals: A case study on ligand-dependent PPAR $\gamma$  dysregulation. *Toxicology*, 392, 140.

Целта на тази публикация беше да представи доказателства, че подходите за молекулярното моделиране могат да бъдат използвани като част от интегрираната стратегия за предсказване на токсичност в съответствие с начина на действие / биологичните пътища на токсичност (MoA/AOP). За да се илюстрира ролята на молекулярното моделиране в изчислителната токсикология, беше проведено изследване, в което бяха приложени подходи на молекулярното моделиране, за да се предскаже активирането на ядрения пероксизомен пролифератор-активиран рецептор гама (PPAR $\gamma$ ), като потенциално молекулярно инициращо събитие (MIE) за чернодробна стеатоза. Беше разработена стъпкова процедура, комбинираща различни *in silico* подходи (виртуален скрининг на базата на докинг и фармакофорно филтриране и анализ на молекулярни полета), за да се проведе скрининг на пълни агонисти на PPAR $\gamma$ , и да се предскаже тяхната трансактивационна активност (EC<sub>50</sub>). Статистическите показатели на класификационния модел за предсказване на пълни агонисти на PPAR $\gamma$  са следните: точност = 81%, чувствителност = 85% и специфичност = 76%. 3D QSAR моделът, разработен за прогнозиране на EC<sub>50</sub> на пълни агонисти на PPAR $\gamma$ , има следните статистически параметри:  $q^2_{cv} = 0.610$ ,  $N_{opt} = 7$ ,  $SEP_{cv} = 0.505$ ,  $r^2_{pr} = 0.552$ . За потвърждаване на връзката между предсказания PPAR $\gamma$  агонизъм и простеатогенен потенциал, молекулярното моделиране беше комбинирано с независимо

извършено механистично извличане на налични данни за токсичност *in vivo*, последвано от ToxPrint анализ на хемотипове. Приложените подходи показаха потенциал за предсказване на MIE, за улесняване на процеса на разработване на MoA / AOP, за повишаване на научната достоверност на AOP, както и демонстрираха потенциал да бъдат основа за разработване на 3D хемотипове.

-----

**8. Jereva D, Fratev F, Tsakovska I, Alov P, Pencheva T, Pajeva I (2017) Molecular Dynamics Simulation of the Human Estrogen Receptor Alpha: Contribution to the Pharmacophore of the Agonists. Math Comput Simulat, 133, 124.**

Човешкият естрогенов рецептор алфа (ER $\alpha$ ) е една от най-изучаваните мишени при *in silico* скрининг на биоактивни съединения. В тази публикация е изследвана естрогеновата активност на огромен брой химикали за техните потенциално неблагоприятни ефекти върху хормоналната регулация на ендокринната система. Общоприетият фармакофор на ER $\alpha$ -агонисти включва терминални фенолни групи и хидрофобен скелетон. В това изследване ние докладваме молекулно-динамични симулации (MD) на ER $\alpha$ , за да получим по-задълбочено структурно знание за взаимодействията агонист-рецептор и фармакофорния модел на съединенията с агонистична активност. Изследването се базира на кристалографска структура на комплекс на ER $\alpha$  с агонист (PDB ID 2P15) с пикомоларен афинитет. Тъй като рентгеновата структура има мутация в съседство с ключов структурен елемент за агонистичната активност на ER $\alpha$  (спирала H12, Y537S), върху мутирания и върху дивия тип рецептор е проведена серия от MD симулации, за да се докаже стабилността на взаимодействията агонист-рецептор. Не е установена значителна разлика във взаимодействието лиганд-протеин между изследваните протеини, което предполага, че Y537S мутантната структура може да се използва за усъвършенстване на фармакофорния модел на агонистите на ER $\alpha$ . Резултатите показват, че фармакофорът на съединения с ER $\alpha$  агонистична активност може да бъде разширен с подструктурен елемент, който заема свободната хидрофобна област в свързващия джоб. Разширеният фармакофорен модел е оценен чрез фармакофор-базиран виртуален скрининг на бази данни с ER $\alpha$  лиганди и декои (съединения, които нямат капацитет за свързване). Резултатите предполагат, че MD симулациите са мощен инструмент за *in silico* изследвания, както на динамиката на протеините, така и за изследване на структурата им, особено когато са налични мутации, които потенциално могат да повлияят структурата и функциите на протеина.

-----

**9. Tsakovska I, Al Sharif M, Alov P, Diukendjieva A, Fioravanzo E, Cronin MTD, Pajeva I (2014) Molecular modelling study of the PPAR $\gamma$  receptor in relation to the Mode of Action/Adverse Outcome Pathway framework for liver steatosis. Int J Mol Sci, 15(5), 7651.**

Задълбоченото разбиране на начина на действие и / или биологичните пътища с нежелан изход (биологични пътища на токсичност) (MoA/AOP) на химикалите се превърна в ключова стъпка към развитието на ново поколение инструменти в изчислителната токсикология. Едно от предизвикателствата на този процес е да се тества приложимостта на подходите за молекулно моделиране, традиционно използвани в рационалния лекарствен дизайн, за да се изследват ключови молекулни инициращи събития (MIE) в рамките на интегрираната стратегия за охарактеризиране на MoA/AOP. Описанието на MoA, водещи до токсичност и увреждане на черния дроб, е в центъра на голям изследователски интерес. Нараства броят на доказателствата, че чернодробната PPAR $\gamma$ -лиганд-зависима активация е ключово MIE в изясняването на чернодробната стеатоза. Синтетичните PPAR $\gamma$ -пълни агонисти предизвикват значително безпокойство, тъй като могат да предизвикат редица неблагоприятни ефекти, които не се наблюдават при частични агонисти. В това изследване е проведено молекулно моделиране на базата на комплекси на PPAR $\gamma$  с пълни агонисти, екстрахирани от базата данни Protein Data Bank. Анализирани са мястото на свързване в рецептора с лиганда и са идентифицирани специфичните взаимодействия лиганд-рецептор за най-активните лиганди. Разработен е фармакофорен модел и най-важните характеристики на фармакофора са идентифицирани и охарактеризирани във връзка с тяхната специфична роля за активиране на PPAR $\gamma$ . Резултатите са



полезни за охарактеризиране на химическото пространство на пълните агонисти на PPAR $\gamma$  и биха могли да улеснят разработването на предварителни правила за филтриране и за ефективен виртуален скрининг на лиганди с пълна агонистична активност спрямо PPAR $\gamma$ .

-----

**10. Tsakovska I, Pajeva I, Alov P, Worth A (2011) Recent advances in the molecular modelling of estrogen receptor-mediated toxicity. Adv Protein Chem Struct Biol, 85, 217.**

През последните две десетилетия нараства загрижеността за потенциално неблагоприятните ефекти на екзогенните ендокринно-активни вещества (EAS), които променят функцията на ендокринната система, като пречат на регулацията на хормоните. Механистичните пътища, по които EAS могат да предизвикат неблагоприятни ефекти, като токсичност за развитие и репродуктивна токсичност, често включват директно свързване с ядрените хормонални рецептори. Със сигурност най-добре изучен ядрен рецептор е естрогеновият рецептор (ER). Разработени са широкомащабни *in vitro* и *in vivo* методи за оценка на естрогеновата токсичност на химикалите. Съществуват обаче етични и финансови проблеми, свързани с тестването върху животни. Подходите на количествените зависимости структура-биологична активност (QSAR) са доказали своята ефективност като инструмент за приоритизиране при оценката на риска от EAS. В допълнение, моделите помагат за изясняването на начина на свързване на взаимодействията вещества. Тъй като естроген-медираните ефекти обикновено са свързани с взаимодействието лиганд-рецептор и тъй като има подробни структурни проучвания на ER, молекулното моделиране заедно с други *in silico* подходи представляват подходящо средство за изучаване на тези естрогенови ефекти. Тази публикация представя обзор на подходите за молекулно моделиране, прилагани при анализ на взаимодействието лиганд-ER. Критично е представен напредъкът в областта и се анализирани някои проблеми въз основа на наскоро публикувани модели, в които тези подходи са приложени.

-----