

РЕЗЮМЕТА НА НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ НА БЪЛГАРСКИ ЕЗИК

НА ГЛ. АС. Д-Р СЕВЕРИНА ЙОРДАНОВА СЕМКОВА

КАНДИДАТ ЗА УЧАСТИЕ В КОНКУРС ЗА ЗАЕМАНЕ НА АКАДЕМИЧНА ДЛЪЖНОСТ „ДОЦЕНТ“ В ОБЛАСТ НА ВИСШЕ ОБРАЗОВАНИЕ 4. ПРИРОДНИ НАУКИ, МАТЕМАТИКА И ИНФОРМАТИКА, ПРОФЕСИОНАЛНО НАПРАВЛЕНИЕ 4.3. БИОЛОГИЧЕСКИ НАУКИ, ПО НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ „БИОФИЗИКА“, КЪМ СЕКЦИЯ „ЕЛЕКТРОИНДУЦИРАНИ И АДХЕЗИВНИ СВОЙСТВА“, ИНСТИТУТ ПО БИОФИЗИКА И БИОМЕДИЦИНСКО ИНЖЕНЕРСТВО, БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ, ОБЯВЕН В ДВ БР. 27/24.03.2023 Г.

❖ Резюмета на научни публикации на български език в издания реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (Web of Science и Scopus), отнасящи се към **група от показатели В (Хабилитационен труд)**:

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

[B1] Nikolova, B., Semkova, S., Tsoneva, I., Antov, G., Ivanova, J., Vasileva, I., Kardaleva, P., Stoineva, I., Christova, N., Nacheva, L. - Characterization and potential antitumor effect of a heteropolysaccharide produced by the red alga *Porphyridium sordidum*. *Engineering in Life Sciences*, 2019, 19(12), 978-985. (IF₂₀₁₉= 1.934, Q2), <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/elsc.201900019>

Резюме Като се има предвид нарастващата тенденция на честотата на раковите заболявания на различни органи, спешно са необходими ефективни терапии за контролна злокачествените заболявания при човека. Въпреки това, почти всички лекарства за химиотерапия, които понастоящем се предлагат на пазара, причиняват сериозни странични ефекти. За щастие, няколко проучвания показват, че нетоксични биологични макромолекули, включително полизахариди от водорасли, притежават противоракови свойства или могат да увеличат ефикасността на конвенционалните химиотерапевтични лекарства. Полизахаридите са характерни вторични метаболити на много водорасли. Ефикасността на действие на полизахаридите върху нормалните и раковите клетки не е добре проучена, но нашите изследвания доказват специфичен за клетките ефект на новоизолиран извънклетъчен полизахарид от червените микроводорасли: *Porphyridium sordidum*. Изследваното вещество е съставено от захарите: ксилоза: глюкоза: галактоза: маноза: рамноза в моларно съотношение 1:0,52:0,44:0,31. Използвана е обратима електропорация за увеличаване на

транспорта през плазмената мембрана в тестваните туморни клетки на рак на гърдата (MCF-7 и MDA-MB231). Прилагането на 75 $\mu\text{g/ml}$ полизахарид в комбинация с 200 V/cm електропорация индуцира 40% намаляване на жизнеспособността на клетките MDA-MB231 и промени в морфологията на клетките, докато контролните клетки (MCF10A) остават с нормална морфология и поддържат жизненост.

[B2] Nikolova, B., Antov, G., Semkova, S., Tsoneva, I., Christova, N., Nacheva, L., Kardaleva, P., Angelova, S., Stoineva, I., Ivanova, J. - Bacterial Natural Disaccharide (Trehalose Tetraester): Molecular Modeling and in Vitro Study of Anticancer Activity on Breast Cancer Cells, *Polymers*, 2020, 12(2), 499. (IF₂₀₂₀= 4.329, Q1), <https://www.mdpi.com/2073-4360/12/2/499>

Резюме Изолирането и характеризирането на нови биологично активни вещества, действащи върху раковите клетки, е важен въпрос на фундаменталните изследвания в биомедицината. Трехалозният липид се изолира от щама *Rhodococcus wratislaviensis* и се пречиства чрез течна хроматография. Ефектът от трехалозния липид върху клетъчната жизнеспособност и миграцията, заедно с анализи за образуване на колонии, бяха извършени върху два типа рак на гърдата (MCF7 - ниско метастатичен; MDA-MB231 - високо метастатичен) и една „нормална“ (MCF10A) клетъчни линии. Проведено е молекулярно моделиране, което детайлизира структурата на неутралната и анионната форма (по-стабилна при физиологично pH) на тетраестера. Определени са и предварителните размери на хидрофилната (7,5 Å) и хидрофобната (12,5 Å) части на молекулата. По този начин използваният трехалозен липид трябва да взаимодейства като единична молекула. Установено е, че промените в морфологията, адхезията, жизнеспособността, миграцията и възможността за образуване на колонии в раковите клетъчни линии, индуцирани след третиране с трехалозен липид, зависят от дозата и времето. Въз основа на теоретичните изчисления беше предложен възможен механизъм на действие основаващ се на мембранна асиметрия между външния и вътрешния монослой на бислоя, водещ до образуването на ендозома. Първоначалните данни предполагат механизъм на противотуморна активност на пречистения трехалозен липид и неговия потенциал за биомедицинско приложение

[B3] Kadinov, B., Nikolova, B., Tsoneva, I., **Semkova, S.**, Kabaivanova, L., Dimitrova, D. - Trehalose lipid biosurfactant reduced cancer cell viability but did not affect the isometric contraction of rat mesenteric arteries *in vitro*. International Journal Bioautomation, 2020, 24(1), 79-86. (SJ_{R2020}=0.178, Q4), https://biomed.bas.bg/bioautomation/2020/vol_24.1/files/24.1_07.pdf

Резюме: Биосърфактантът от трехалозен липид от щама *Nocardia farcinica* е вещество с естествен произход, приживащо мощна противоракова активност. Нарастващият интерес към модалността на лечението на рака, базирана на естествени вещества, изисква проучване на възможните неблагоприятни ефекти на тези вещества, включително ефектите върху съдовата система. Поради това настоящото проучване е предназначено да изследва ефекта на липида от трехалоза върху изометричната контракция на изолирани мезентериални артерии от плъхове. Съкратителните отговори на артериите под действие на трехалозен липид бяха изследвани с помощта на миография на малки кръвоносни съдове. Бяха изследвани изометричните контракции на мезентериални артериални пръстени на плъхове с непокътнат ендотел. Ефектът на този биосърфактант е оценен в артерии, предварително контрактирани с 42 mM KCl като съдов деполяризиращ стимул на гладката мускулатура на съдовете. Резултатите показаха, че липидът от трехалоза (75 μM) не успява да промени високите K⁺ - индуцирани контракции. Наблюдаваната липса на ефект на биосърфактанта трехалоза върху контрактилитета на мезентериалните артерии на плъхове *in vitro* заедно с установяване на намалена жизнеспособност на раковите клетки го прави подходящ за потенциално медицинско приложение.

[B4] **Semkova, S.**, Antov, G., Iliev, I., Tsoneva, I., Lefterov, P., Christova, N., Nacheva, L., Stoineva, I., Kabaivanova, L., Staneva, G. - Rhamnolipid Biosurfactants - Possible Natural Anticancer Agents and Autophagy Inhibitors. Separations, 2021, 8(7), 92. (IF₂₀₂₁= 2.777, Q3), <https://www.mdpi.com/2297-8739/8/7/92>

Резюме Предистория/цел: Редица биологично активни вещества са доказани като алтернатива на конвенционалните противоракови лекарства. Целта на изследването е *in vitro* изследване на противораковата активност на моно- и ди-Rhamnolipids (RL-1 и RL-2) срещу рак на гърдата при човека. В допълнение се анализира комбинацията с цисплатина. Материали и методи: Клетъчните линии на гърдата (MCF-10A, MCF-7 и MDA-MB-231) се третират с RL и в комбинация с цисплатина. Жизнеспособността се анализира с използване на МТТ анализ и изследването на автофагията се извършва чрез оцветяване с акридиново оранжево. Резултати: За разлика от здравите клетки и двете тествани ракови

линии показват чувствителност към третирнето с RL. Този ефект е придружен от влияние върху свързания с автофагията процес на образуване на киселини структури. Само за тройно-негативната клетъчна линия на рак на гърдата (MDA-MB-231) се наблюдава синергичният ефект на комбинираното лечение (10 μ M цисплатина и 1 μ g/ml RL-2). Заключение: Въз основа на проучвания за реорганизация на мембранни модели в присъствието на RL и данни за по-голямо количество липидни рафтове в мембраните на раковите клетки, отколкото в не-туморогенните, ние предлагаме възможен механизъм на ремоделиране на мембраната чрез образуване на ендозоми. Накратко, за да има синергичен ефект, е необходимо да имаме и цисплатина и RL-2, тъй като RL-2 е молекула, предизвикваща положително изкривяване на мембраната.

[B5] Todinova, S., Nikolova, B., Iliev, Ivan; Semkova, S., Krumova, S., Taneva, S. - Thermodynamic behavior of breast cancer cell lines after miltefosine and cisplatin treatment. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2022, 147, 7819–7828. (IF₂₀₂₁=4.755, Q2), <https://link.springer.com/article/10.1007/s10973-021-11094-6>

Резюме Ракът на гърдата показва различен отговор на лекарственото лечение. В тази работа ние анализирахме и сравняваме ефекта на две противоракови лекарства, които се различават по основното си действие: милтефозин и цисплатина (cis-Pt), върху два различни вида рак на гърдата (ниско метастатична (MCF-7) и високо метастатична (MDA-MB -231) клетъчни линии) и една нормална епителна (MCF-10A) клетъчна линия на гърдата. Ефектът на cis-Pt и милтефозин върху термодинамичното поведение на раковите клетъчни линии беше анализиран чрез диференциална сканираща калориметрия, клетъчната морфология и жизнеспособност бяха определени чрез оптична микроскопия и МТТ тест. Ние разкрихме различни ефекти на милтефозин и cis-Pt върху термодинамичното поведение и жизнеспособността на раковите и нормалните клетки. Най-важното ни наблюдение е, че нормалните MCF-10A клетки са драстично засегнати от милтефозин, но не и от cis-Pt. Клетъчната линия MDA-MB-231, от друга страна, е по-податлива на cis-Pt от MCF-7 клетките, докато и двете ракови клетъчни линии са еднакво засегнати от милтефозин. Свързаната с лекарството промяна на термичното разгръщане на клетъчните съставки корелира с промените в клетъчната жизнеспособност. Изменението в термодинамично поведение на раковите клетки след лечението с лекарства силно показва промяна в конформацията на протеините в раковата клетъчна мембрана, клетъчния матрикс и ДНК-съдържащите структури.

[B6] Tsoneva, I., **Semkova, S.**, Bakalova, R., Zhelev, Zh., Nuss, Ph., Staneva, G., Nikolova, B. - Electroporation, electrochemotherapy and electro-assisted drug delivery in cancer. A state-of-the-art review. Biophysical Chemistry, 2022, 286(2022), 106819. (IF₂₀₂₁=2.352, expected IF₂₀₂₁=3.628, Q2)
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0301462222000618?via%3Dihub>

Резюме Това ревю е фокусирано върху електрохимиотерапията, която представлява доставяне на противоракови лекарства с помощта на електрически импулси с високо напрежение. Техническите проблеми, изборът на лекарства и протоколите за доставяне на лекарства все още се изследват активно и не е постигнат консенсус относно тях. В настоящата статия се обсъждат различните аспекти на електрохимиотерапията. Тук е включват въпросите относно избора на предпочитаното противораково лекарство и дозата, която се прилага върху солидни тумори. Друга обещаваща област е свързана с електро-подпомогнато освобождаване на наночастици (квантови точки) в трансплантирани солидни тумори. Молекулярните механизми за подобро доставяне на лекарства се обсъждат по отношение на високи холестеролни нива и голяма част от липидни рафтове в раковите клетки. Електрохимиотерапията е парадигматичен пример за сътрудничество между физици, биофизици, химици, техници, производители, биолози, клиницисти и пациенти за подобряване на много обещаващо предоставяне на лечение в съответствие с концепцията за персонализирана медицина

❖ Резюмета на научни публикации на български език, в издания реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (Web of Science и Scopus), отнасящи се към **група от показатели Г**:

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

[Г1] **Semkova S.**, Nikolova, B., Zhelev, Zh., Tsoneva, I., Zlateva, G., Aoki, I., Bakalova R. - Loading Efficiency of Polymersomes with Contrast Agents and their Intracellular Delivery: Quantum Dots Versus Organic Dyes. Anticancer research, 2018, 38(2), 825-831. (IF₂₀₁₈= 1.935, Q2), <https://ar.iijournals.org/content/38/2/825>

Резюме: Цел: контрастните наноносители като системи за доставка на лекарства, способни на селективно доставяне до ракови клетки и солидни тумори, са от съществено значение за разработването на нови диагностични и терапевтични стратегии. Настоящото проучване има за цел да изследва ефективността на зареждане на полимерзоми на основата на хитозан с

флуоресцентни контрастни вещества [квантови точки (QD) и конвенционални органични багрила] и възможността за контролиране на тяхното освобождаване от полимерната матрица в клетките чрез химически модификации и електропорация. Материали и методи: Всички изследвани флуорофори се задържат в полимерната глобула чрез електростатично и хидрофилно-хидрофобно взаимодействие, без конюгация с полимера. Флуорофорно заредените полимерзоми се охарактеризират с динамично разсейване на светлината, титруване на зета-потенциал и флуоресцентна спектроскопия. Освобождаването на флуорофор от полимерзомите, пасивно или след електропорация, се открива чрез 5-стъпкова спин-ултрафилтрация, комбинирана с флуоресцентна спектроскопия на горната фаза (супернатанта) на филтърната единица. Пасивното вътреклетъчно доставяне на наночастиците до HeLa клетки беше открито чрез флуоресцентна конфокална микроскопия. Резултати: QD се задържат плътно и непрекъснато в полимерната матрица, докато органичните флуорофори [флуоресцеин изотиоцианат (FITC), FITC-dextran10 000 и FITC-декстран70 000] се освобождават бързо от полимерзомите. Детергентът Brij значително увеличи задържането на FITC-декстран 10 000 в полимерната глобула. Електропорацията до 1000 V/cm не предизвиква освобождаване на QD от полимерзомите, но ускорява освобождаването на FITC-декстран 10 000 Brij от полимерната матрица. Импулсите с високо напрежение (над 750 V/cm) също предизвикват фрагментация или агрегация на наночастиците. QD-маркираните полимерзоми проникват пасивно в раковите клетки след 24-часова инкубация. Заключение: Резултатите предполагат, че маркираните с QD полимерзоми са подходящи флуоресцентни сонди и система за доставка на нанолечества с големи възможности за проследяване за *in vitro* и *in vivo* приложения. Освен това зареждането на полимерзоми с органични багрила с различни молекулни тегла (като FITCdextrans) е прост модел за визуализиране и прогнозиране на скоростта на освобождаване на малки органични молекули (например конвенционални лекарства, други контрасти, стабилизатори и добавки) от полимерната матрица.

[Г2] Zhelev, Zh., Georgieva, E., Lazarova, D., Semkova, S., Aoki, I., Gulubova, M., Higashi, T., Bakalova, R. - "Redox imaging" to distinguish cells with different proliferative indexes: Superoxide, hydroperoxides, and their ratio as potential biomarkers. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, vol. 2019, Article ID: 6373685, 18 pages. (IF₂₀₁₉ = 5.076, Q1), <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2019/6373685/>

Резюме: 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.

[ГЗ] Ivanova, D., Zhelev, Zh., Semkova, S., Aoki, I., Bakalova, R. - Resveratrol modulates the redox-status and cytotoxicity of anticancer drugs by sensitizing leukemic lymphocytes and protecting normal lymphocytes. Anticancer Research, 2019, 39(7), 3745-3755. (IF₂₀₁₉= 1.994, Q2), <https://ar.iiajournals.org/content/39/7/3745>

Резюме: Цел: Изследването е насочено към ефекта на ресвератрол върху редокс-статуса и жизнеспособността на левкемични и нормални лимфоцити, както и към способността му да повишава чувствителността на левкемични лимфоцити към химеотерапевтици.

Материали и методи: Определянето на цитотоксичността се извършва чрез оцветяване с трипаново синьо, индукцията на апоптоза – чрез тест за експресия на Анексин V, и оксидативен стрес – чрез определяне вътреклетъчните нива на реактивни кислородни видове (ROS) и протеин-карбонил продукти.

Резултати: Инкубирането на ресвератрол в комбинация с повечето от изследваните противоракови лекарства е довело до по-високи токсичност,

отколкото ресвератрол или химеотерапевтика приложени самостоятелно. При третиране на левкемия лимфоцити с барасертиб и еверолимус, в присъствие на ресвератрол, се наблюдава синергичен цитотоксичен ефект придружен от силна индукция на апоптоза, повишаване на нивата на хидропероксиди и незначителни промени в протеин-карбонилните продукти. Не се наблюдават промени в тези параметри при нормалните лимфоцити.

Заклучение: Ресвератрол е обещаващ допълнителен елемент към противораковата терапия, който може да позволи намаляване на терапевтичните дози на химеотерапевтиците барасертиб и еверолимус, свеждайки до минимум техните странични ефекти.

[Г4] Semkova, S., Zhelev, Zh., Miller, T., Sugaya, K., Aoki, I., Higashi, T., Bakalova, R. - Menadione/ascorbate induces overproduction of mitochondrial superoxide and impairs mitochondrial function in cancer: comparative study on cancer and normal cells of the same origin. *Anticancer Research*, 2020, 40(4), 1963-1972. (IF₂₀₂₀= 2.480, Q2), <https://ar.iiajournals.org/content/40/4/1963>

Резюме: Цел: Комбинацията Менадион/Аскорбат (М/А) привлича вниманието поради необичайната способност на тази про-витамин/витамин комбинация да убива ракови клетки без да засяга преживяемостта на нормалните (здрави) клетки. Целта на настоящото проучване беше да се изясни ролята на М/А при таргетирането на ракови митохондрии.

Материали и методи: Използвани са няколко ракови и здрави клетъчни линии от еднакъв произход. Клетките са третирани с различни концентрации на М/А за 24 ч. Клетъчната преживяемост, митохондриалният супероксид, митохондриалният мембранен потенциал и количествата сукцинат са анализирани след третиране с помощта на конвенционални аналитични тестове.

Резултати: М/А показва силно специфично потискане на растежа и жизнеспособността на раковите клетки, без да повлиява неблагоприятно жизнеспособността на нормалните клетки при концентрации, постижими чрез орално или парентерално приложение *in vivo*. Този ефект е придружен от: (i) изключително високо производство на митохондриален супероксид в раковите клетки, но не и в нормалните клетки; (ii) значителна дозо-зависима деполяризация на митохондриалната мембрана и изчерпване на онкомаболитния сукцинат в раковите клетки.

Заклучение: Противораковият ефект на М/А е свързан с индуцирането на

тежък митохондриален оксидативен стрес само в раковите клетки. По този начин М/А има потенциал да увеличи чувствителността и уязвимостта на раковите клетки към конвенционалната противоракова терапия и имунната система.

[Г5] Bakalova, R., Semkova, S., Ivanova, D., Zhelev, Zh., Miller, T., Takeshima, Ts., Shibata, S., Lazarova, D., Aoki, I., Higashi, T. - Selective targeting of cancerous mitochondria and suppression of tumor growth using redox-active treatment adjuvant. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, vol. 2020, Article ID: 6212935, 30 pages. (IF₂₀₂₀= 6.543, Q1), <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2020/6212935/>

Резюме: Веществата, които повлияват редокс-статуса на клетките и техните комбинации, например хинон/аскорбат и менадион/аскорбат (М/А; наричан още Aratone®), 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 (експресията 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 $\mu\text{M}/\mu\text{M}$), 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, ВЕЗ-235, бортезомиб, цисплатин, еверолимус, ломустин, лонафарниб, МG-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 понижавачи 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 имуен отговор.

[Г6] Nikolova, B., Semkova, S., Tsoneva, I., Stoyanova, E., Lefterov, P., Lazarova, D., Zhelev, Zh., Aoki, I., Higashi, T., Bakalova, R. - Redox-related molecular mechanism of sensitizing colon cancer cells to camptothecin analog SN38. *Anticancer Research*, 2020, 40(9), 5159-5170. (IF₂₀₂₀= 2.480, Q2), <https://ar.iijournals.org/content/40/9/5159.long>

Резюме: 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 АВС преносители.

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

Заключение: Противораковият ефект на комбинираното лечение на SN38 и ЕР 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.

[Г7] Semkova, S., Ivanova, D., Nikolova, B., Zlateva, G., Bakalova, R., Zhelev, Zh., Aoki, I. - Inhibition of ATP-synthase potentiates cytotoxicity of combination drug menadione/ascorbate in leukaemia lymphocytes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2021, 35(1), 1738-1744. (IF₂₀₂₀= 1.632, expected IF_{2021/2022} = 1.762, Q3), <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13102818.2021.1996268>

Резюме: Комбинираното лекарство менадион/аскорбат (М/А) проявява синергичен, дозозависим, антипролиферативен и цитотоксичен ефект спрямо раковите клетки, но не и спрямо нормалните клетки от същия произход, особено в концентрации, които могат да бъдат постигнати *in vivo* чрез пероралното им, както и чрез парентералното им приложение. Предполага се, че М/А въздейства селективно върху дисфункционаращите митохондрии на ракови клетки. Точният молекулен механизъм обаче все още не е ясен. Целта на настоящото изследване бе да се изясни ролята и на аденозинтрифосфат (АТФ) синтазаната активност и нейното супресирание чрез олигомицин-А върху индуцираната от М/А цитотоксичност, образуване на митохондриален супероксид анион радикал и нивото на АТФ при левкемични лимфоцити. Клетките бяха третирани с различни концентрации на М/А в отсъствие и в присъствие на олигомицин-А (100 ng/mL) за 24 часа и 48 часа. С помощта на конвенционални аналитични методи бяха анализирани клетъчният растеж и жизнеспособност, нивата на АТФ и митохондриалния супероксид анион радикал. Резултатите показват, че потискането на активността на АТФ синтазата от олигомицин-А води до намалява клетъчния растеж и жизнеспособност и увеличаване на производството на митохондриален супероксид, както и изчерпването на АТФ в клетки, третирани с

ниски/поносими дози М/А (до 5/500 $\mu\text{M}/\mu\text{M}$), в сравнение с клетките третирани само с М/А. Олигомицин-А не повлиява тези параметри в клетките, третирани с висок дози от М/А (10/1000 и 20/2000 $\mu\text{M}/\mu\text{M}$). Инхибирането на АТФ синтазата насърчава цитотоксичност на М/А, особено при левкемични лимфоцити, третирани с ниски/поносими дози. Ние приемем, че цитотоксичността на М/А е тясно свързана с инициране на увреждане на оксидативното фосфорилиране, както и че изчерпването на митохондриалния АТФ е решаващ фактор за клетъчната смърт.

[Г8] Ivanova, D., Yaneva, Z., Bakalova, R., Semkova, S., Zhelev, Zh. - The antimalaria drug artemisinin displays strong cytotoxic effect on leukaemia lymphocytes in combination with vitamin c and pro-vitamin K3. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, 2021, 24(4), 533-543. (SJР₂₀₂₁=0.157, Q4), <http://www.unisz.bg/bjvm/BJVM%20December%202021%20p.533-543.pdf>

Резюме: Това проучване изследва противораковия ефект на противопаразитното лекарствено средство артемизинин, в комбинация с два редокс модулятора: витамин С и провитамин К3 (С/К3). Експериментите са проведени върху левкемични лимфоцити, Jurkat клетъчна линия. Клетките бяха третирани с артемизинин, или с витамините С/К3 самостоятелно, както и в комбинации от трите съединения. Клетъчната пролиферация и жизнеспособност бяха анализирани чрез метода на трипаново синьо и автоматично преброяване на клетките. Резултатите показват, че артемизинин (>10 μM) потиска клетъчната пролиферация, но не предизвиква клетъчна смърт до концентрация 500 μM . Противопаразитното лекарствено средство демонстрира ясно изразен цитостатичен ефект при концентрации в диапазона от 250 μM – 500 μM – клетките не се размножават, но са все още живи. Комбинацията от витамините С/К3 (200:2, 300:3 μM / μM), приложени самостоятелно, не повлияват клетъчната пролиферация и жизнеспособност. Витамините С/К3 в концентрационно съотношение 500:5 ($\mu\text{M}/\mu\text{M}$) намаляват активността на клетъчната пролиферация с ~10%. Тройната комбинация от артемизинин/ витамин С/провитамин К3 проявява синергични антипролиферативни ефекти при всички анализирани концентрационни съотношения. Този синергичен ефект се усилва с повишаване на концентрацията на витамините С/К3. Въз основа на литературни данни се предполага, че антипролиферативният ефект на тройната комбинация е медиран от промени в редокс-хомеостаза на раковите клетки. Редокс системата С/К3 вероятно действа върху митохондриалната активност на раковите клетки и

повишава производството на супероксид анион радикал, както и активира проапоптотични сигнални пътища, специфични за раковите клетки. Но от друга страна, артемизинин може да доведе до образуване на хидроксилни радикали в резултат на активиране на реакциите на Фентън, както и изчерпване на вътреклетъчните редуциращи еквиваленти. Комбинацията от двата редокс механизма водят до активиране на сигнални пътища за индуциране на смърт при ракови клетки.

[Г9] Lazarova, D., Semkova, S., Zlateva, G., Tatsuya, H., Aoki, I., Bakalova, R. - Quantum sensors to track total redox-status and oxidative stress in cells and tissues using electron-paramagnetic resonance, magnetic resonance imaging, and optical imaging. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(5), 2828-2837. (IF₂₀₂₀= 6.986, expected IF₂₀₂₁= 8.008, Q1), <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.0c04116>

Резюме: 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 и 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 (TRP). TRP 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.

[Г10] Ivanova, D., Semkova, S., Yaneva, Z., Nikolova, B., Zhelev, Zh., Bakalova, R., Aoki, I. - Docosahexaenoic Acid Potentiates the Anticancer Effect of the Menadione/Ascorbate Redox Couple by Increasing Mitochondrial Superoxide and Accelerating ATP Depletion. *Anticancer Research*, 2023, 43(3), 1213-1220. (IF₂₀₂₀= 2.480, expected IF₂₀₂₁= 2.435, Q2), <https://ar.iiajournals.org/content/43/3/1213>

Резюме: Цел: Митохондриално – насочените противоракови лекарства („митокани“/ “mitocans”) с природен произход са атрактивни кандидати за употреба като адюванти при раковите терапии. Редокс двойката менадион/аскорбат (M/A), която принадлежи към семейството на „митоканите“, индуцира селективно оксидативен стрес в раковите митохондрии и респективно в раковите клетки. За Докозахексаенова киселина (DHA) е доказано, че регулира мевалонатният метаболитен път, който е тясно свързан с пренилирането на цитотоксичният менадион до нецитотоксичен менхинон. Целта на това проучване беше да се оцени способността на DHA да потенцира противораковият ефект на M/A посредством увеличаване на продукцията на ROS, както и чрез повлияване на стационарните нива на АТФ в раковите клетки.

Материали и методи: Експериментите са проведени на левкемични лимфоцити (Jurkat). Клетките са третирани с DHA, M/A и техни комбинации (M/A/DHA) и са оценени 4 параметъра посредством: оценка на клетъчна преживяемост и пролиферация, определяне нивата на АТФ, митохондриален супероксид и вътреклетъчни пероксида. Три независими експеримента, включващи 2 до 6 измервания са извършени за всеки отделен параметър.

Резултати: Тройната комбинация M/A/DHA се характеризира с много висока антипролиферативна активност и цитотоксичност, отколкото M/A и DHA, прилагани самостоятелно. DHA значително ускорява M/A-индуцираното изчерпване на АТФ в клетките, което е придружено от допълнително увеличение на митохондриалния супероксид в сравнение с клетките, третирани само с M/A или DHA.

Заклучение: DHA значително повишава M/A-индуцираната цитотоксичност в левкемични лимфоцити чрез индуциране на тежък митохондриален оксидативен стрес и ускорено изчерпване на АТФ. Предполага се, че селективното DHA-медирано потискане на синтеза на холестерол в раковите клетки (със

значение в пренилирането на цитотоксичния менадион до по-малко цитотоксичния филохинон), както и ДНА-медираното инхибиране на супероксид дисмутазата, са в основата на потенцирането на противораковия ефект на М/А .

[Г11] Semkova, S., Nikolova, B., Tsoneva, I., Antov, G., Ivanova, D., Angelov, A., Zhelev, Zh., Bakalova, R. - Redox-mediated anticancer activity of anti-parasitic drug Fenbendazole in triple-negative breast cancer cells. *Anticancer Research*, 2023, 43(3), 1207-1212. (IF₂₀₂₀= 2.480, expected IF₂₀₂₁= 2.435, Q2), <https://ar.iijournals.org/content/43/3/1207>

Резюме: Цел: Все по-голям брой проучвания съобщават за противоракова активност на широко използвани антипаразитни лекарства и особено бензимидазоли. Фенбендазолът се счита за безопасен и поносим при повечето животински видове в ефективните дози като антихелминтик. Малко се знае за редокс-модулиращите свойства на фенбендазола и молекулярните механизми на неговите антипролиферативни ефекти. Нашето проучване имаше за цел да проучи възможността за селективно редокс-медирано третиране на тройно негативни ракови клетки на гърдата с фенбендазол, без да се засяга жизнеспособността и редокс - статуса на нормални епителни клетки на гърдата.

Материали и методи: Експериментите бяха проведени върху три клетъчни линии: нормални епителни клетки на гърдата (MCF-10A) и ракови епителни клетки на гърда (MCF7 – луминален аденокарцином, ниско метастатичен; MDA-MB-231 – тройно негативен аденокарцином, силно метастатичен). Клетките бяха третирани с фенбендазол в продължение на 48 часа и три параметъра бяха анализирани с помощта на конвенционални анализи: клетъчна жизнеспособност и пролиферация, ниво на вътреклетъчен супероксид и ниво на хидропероксида.

Резултати: Данните показват, че клетките MDA-MB-231 са по-уязвими към предизвикания от фенбендазол оксидативен стрес, отколкото клетките MCF-7. В нормалните епителни клетки на гърдата MCF-10A, фенбендазол значително потиска оксидативния стрес в сравнение с нетретирани контроли. Тези данни корелират с ефекта на фенбендазол върху клетъчната жизнеспособност и стойностите на IC₅₀, което е косвено доказателство за потенциалния насочен противораков ефект на лекарството, особено в MDA-MB-231 клетки.

Заключение: Разликата в нивата на оксидативен стрес, предизвикан от фенбендазол в MDA-MB-231 и MCF-7 клетки показва, че двата вида рак на гърдата реагират на лекарството чрез различни редокс-свързани механизми.