**СПРАВКА ЗА ОСНОВНИТЕ ПРИНОСИ В НАУЧНИТЕ ТРУДОВЕ**

**на чл. кор. проф. дбн Румен Георгиев Панков**

**І. Приноси с фундаментален характер**

А. Изследвания върху клетъчната сигнализация, медиирана от интегриновите рецептори и ролята ѝ в регулирането на основни жизнени процеси като клетъчната пролиферация, програмираната клетъчна смърт, клетъчната подвижност и организацията на извънклетъчния матрикс.

*- Организация и функциониране на клетъчните адхезивни контакти в in vivo*-*подобни, триизмерни клетъчни култури. Особености в интегриновата сигнализация*

1. Описани са и са охарактеризрани нови за науката клетъчни структури - адхезивни контакти, формирани от фибробластни клетки *in vivo* (3D адхезии). Откриването на тези структури решава еднозначно дълго дискутирания въпрос за наличието на клетъчни адхезивни контакти в нормалните тъкани. За лабораторното изучаване на този нов вид клетъчни контакти е разработена и моделна система за отглеждане на клетки в триизмерни условия, наподобяващи триизмерните условия в организма. Интегрините α5β1, организирани в тези 3D адхезии, имат специфична сигнализация, която предизвиква повишена пролиферация, миграция и променена клетъчна морфология (№ 29, 31, 36, 57, 58, 75, 87, 93, 101, 104 и 110). Откриването на тези нови адхезии подпомага изясняването на разликите в поведението на клетките, когато се отглеждат в лабораторни условия и когато са част от живите тъкани.

2. Установен е новият за науката факт, че клетки, отглеждани в in vivo-подобни условия постигат забавяне на клетъчния растеж и преминаване в състояние на покой (quiescence) чрез секвестиране на регулатора на клетъчния цикъл – киназата ERK1/2 в липидните рафтове. Предложена е хипотезата, че това е част от механизмите, които поддържат клетъчния покой, типичен за повечето тъкани в живите организми (№ 93, 96, 106)

*- Механизми на интегриновата сигнализация*

3. Формулирана е хипотезата за секвенционна специфичност на интегриновата сигнализация, според която определени аминокиселинни остатъци от цитоплазмения домен на β1 интегрина са отговорни за предаване на специфични сигнали. В подкрепа на тази хипотеза е показано, че триптофанът в позиция 775 е необходим за интегриновата сигнализация, регулираща активността на Akt и навлизането на клетките в апоптоза (№ 38). Този триптофан, заедно с аргинин в позиция 760 участват в регулирането на активираното състояние на интегрин β1 и способността на този интегринов рецептор да осъществява образуването на фибронектиновия матрикс (№ 61). Създадената хипотеза изяснява как една и съща интегринова молекула може да участва в предаването на различни по характер сигнали.

*- Сигнализация, регулираща клетъчното движение*

4. Установено е, че интегриновите рецептори регулират различни аспекти на клетъчната подвижност чрез активиране на два различни сигнални пътя: FAK - p130Cas, който регулира насочената миграция и Shc – MAPK, контролиращ произволната миграция. Туморният инхибитор PTEN потиска и двата сигнални пътя чрез дефосфорилиране на FAK и Shc. Балансът от активността на PTEN, FAK и Shc определя крайните характеристики на интегриново стимулираната клетъчна подвижност (№ 26). Установеният феномен е важен за по-доброто разбиране на метастатичната активност на туморните клетки.

5. Показано е, че един от регулаторите на актиновия цитоскелет – малката ГТФаза Rac, участваща в регулацията на актиновия цитоскелет, работи като „превключвател” сменящ начина на придвижване на фибробластни и епителни клетки. Експериментално е демонстрирано, че намалявне на активността й променя произволната миграция в насочено движение. Механизмът по който работи Rac e различен от известния механизъм, опериращ при насоченото движение при хемотаксис (№ 48, 50).

*- Регулация на експресията, биологична активност и еволюционни промени при цитоскелетните кератинови белтъци*

6. Установени са биохимичния състав, ултраструктурата и имунологичните отнасяния на кератиновите белтъци, образуващи интермедиерните филаменти в черния дроб на представители от различни систематични групи гръбначни животни. Получените нови данни са принос в установяване на промените в цитокератиновите белтъци в процеса на еволюцията (№ 3, 4, 7).

7. Показано е, че първият интрон на човешкия ген за кератин 18 съдържа регулаторни елементи състоящи се от активатор, включващ близко разположени места за свързване на транскрипционните фактори Ets и AP-1 и три негативни регулаторни елемента. Показано е, че активаторът е директна мишена за сигналния път регулиран от Ras онкогена, което обяснява молекулярния механизъм на повишената или възникваща *de novo* експресия на кератин 18 в множество карциноми. Установено е, че индукцията на кератин 18 след диференциация е резултат от два независими процеса: а) освобождаване на потискащото действие на негативните регулаторни елементи и б) активиране на транскрипцията на членове на Ets и AP-1 транскрипционните фактори (№ 17, 19, 20).

8. Установено е, че кератин 18, участващ в образуването на чернодробните интермедиерни филаменти, има способност да потиска подвижността, нарастването на клетките в мек агар и туморогенността *in vivo*. Получените резултати подкрепят възможността, експресията на кератин 18 да е свързана с един от начините за поддържане на нормалния клетъчен фенотип и подкрепят общият възглед, че интермедиерните филаменти са отговорни за поддържане на диференцираното състояние на клетките (№ 22).

*- Идентифициране и характеризиране на микротубуло-асоциирани белтъци*

9.С помощта на новосъздадено моноклонално антитяло е характеризиран нов белтък от групата на «белтъците пътници» (passengers), които се характеризират със специфична локализация, зависеща от клетъчния цикъл. Той е компонент на кинетохорите през метафаза и асоциира с кинетохорните микротубули през анафаза, като най-вероятно регулира стабилността им. Получените резултати са принос в изясняване молекулните механизми на функциониране на кинетохорите и делителното вретено през метафаза, анафаза и телофаза (№ 9 и 18).

*- Организация и функциониране на клетъчните адхезивни контакти в класически монослойни клетъчни култури*

10.Чрез knock out техниката е показано, че фокалните контакти на адхезия могат да бъдат образувани и в отсъствие на един от основните компоненти на интегриновите комплекси – винкулинът. Той е най-ранно реагиращия на пролиферативно стимулиране белтък от всички изследвани интегриново-асоциирани белтъци, но клетките могат od компенсират липсата му чрез увеличаване количеството на други белтъци със сходна функция - талин, α-актинин и паксилин, които също са локализирани в тези структури. Резултатите подкрепят формулирания възглед за множественост на връзката между интегриновите рецептори и актиновия цитоскелет (№ 14 и 21).

11. Изяснен е начинът, по който интегриновите рецептори участват в отлагането и изграждането на фибронективновия извънклетъчен матрикс. Демонстрирано е, че докато витронектиновият рецептор αVβ3 присъства постоянно във фокалните контакти на адхезия, след активиране α5β1 интегрините придобиват специфична конформация, която им позволява да напуснат тези контакти и да се придвижат по клетъчната повърхност. Придвижващите си интегрини образуват нов тип адхезивни контакти - фибриларни адхезивни контакти, в които се извършва фибронектиновата полимеризация. Създаден е модел, базиран на установената транслокация на активираните α5β1 интегрини, който обобщава механичните и сигналните функции на този интегрин при изграждане на фибронектиновия извънклетъчен матрикс (№ 28, 30, 32, 46, 47 и 104).

12.Установено е, че кинектинът е нов компонент на интегриновите адхезивни комплекси. Акумулирането му в тях се осигурява от секвенции локализирани в две области – N- (1-326) и С-кря (935-1365) на молекулата. Резултатите дават възможност да се предположи, че кинектинът, заедно с интегрините, участва в регулирането и локализацията на адхезивно-стимулирания белтъчен синтез (№ 33).

13.Установено е, че физиологични дози от анестетикът халотан повлияват клетъчната адхезия и потискат продукцията на сърфактант в човешки белодробни карциномни А549 клетки (моделна система за пневмоцити тип ІІ). Показано е, че промените в клетъчната адхезия са резултат от инхибиране на фосфорилирането на основни сигнални и структурни белтъци изграждащи адхезивните контакти. Получените резултати са принос в изясняването на токсичното влияние на този анестетик върху белодробните клетки (№ 37, 39, 42, 43, 45 и 53).

Б. Изследвания върху нативни и моделни мембранни системи

*- Състав и структурна организация на плазмени мембрани при клетки, отглеждани в класически монослойни и в in vivo-подобни, триизмерни клетъчни култури*

14. Доказано е, че присъствието на интегринови рецептори в плазмените мембрани при клетки, отглеждани като класически, монослойни култури, повлиява трансмембранната локализация и динамичното разпределение на холестероловите молекули между двата мембранни монослоя (№ 49).

15. При клетки отглеждани в триизмерни (3D) условия са установени нови данни изразяващи се в значителни различия в състава и структурната организация на плазмените мембрани в сравнение с клетки, куливирани в конвенциални условия под формата на монослой (2D). Намерени са значителни различия в основните липидни компоненти на мембранните рафт-домени. Особен интерес представляват наблюдаваните различия в клетъчния редокс потенциал, както и по-високата устойчивост към оксидативни увреждания на мембранните липиди при 3D клетките. При тях се наблюдават по-високи нива на сфингомиелин, който притежава антиоксидантен потенциал, поради което проявява протективен ефект по отношение окислението на мембранните фосфолипиди и холестерол. Предложена е хипотеза, според която по-високото ниво на сфингомиелин е свързано с по-нисък флуидитет и понижена пропускливост на плазмените мембрани на 3D клетки. Установено е различно фазово поведение и структурна организация на мембранните липиди при 2D и 3D клетки (№ 62, 63, 66, 67, 69, 77, 101 и 112).

*- Влияние на онкогенната трансформация върху клетъчните мембрани*

16.Установено е, че Ras онкогенната трансформация на фибробласти води до:

а) промени в нативната асиметрия на мембраните фосфолипиди, изразяваща се предимно в транслокация на фосфатидилсерина от вътрешния към външния мембранен монослой (№ 27), б) повишаване активността на микрозомалната арахидоноил-СоА:лизофосфатидилхолин ацилтрансфераза, индуцирано от нивото на сфингомиелина в мембраните, както и специфично инхибиране на ензима от церамиди (№ 24), в) повишаване на активността на плазмено мембранната фосфолипаза А2, индуцирано специфично от фосфатидна киселина (№ 23, 24, 25, 27). Получените резултати са принос за изясняване на мембранните промени при онкогенна трансформация.

*- Експериментално повлияване на фосфолипидния състав и ензимните активности в клетъчни мембрани*

17. Установени са нови данни за промените в мембранните фосфолипиди в процеса на стареене и влиянието на резвератролът, който действа като мощен антиоксидант на мембранно ниво. Това го прави подходящ за включване в комплексни терапии, насочени към повлияване на оксидативния статус и процесите на стареене на мембраните и клетките като цяло (№ 86, 92, 98, 101).

18.Показано е, че приемането на пребиотици води до понижение на съотношението наситени/ненаситени мастни киселини във фосфолипидните молекули и на относителното съдържание на холестерол спрямо тоталните липиди в чернодробни плазмени мембрани при експериментални животни Тези данни могат да бъдат полезни за изясняване на молекулярните механизми, лежащи в основата на благоприятните ефекти на пребиотиците върху организмите, както и за развитието на нови терапевтични подходи за подобряване на здравето на човека . (№ 79, 89, 90).

19.Установено е, че интоксикация с пестицида карбикрон води до понижение на тоталните фосфолипиди и липид-пренасящата активност в белодробния алвеоларен сърфактант. Показано е, че този пестицид предизвиква намаление на общото фосфолипидно съдържание, потискане на активностите на фосфолипаза А2 и фосфолипаза С, както и понижение на структурната подреденост на чернодробни плазмени и микрозомални мембрани. Получените данни са принос в изясняване токсичното действие на този пестицид (№ 13 и 16).

20.Показано е, че при чернодробна регенерация, предизвикана от частична хепатектомия, се активират редица мембранно свързани ензими, участващи в липидния метаболизъм – палмитоил СоА и олеоил-СоА синтетази, лизофосфолипид ацилтрансфераза и фосфолипаза С (№ 15).

21.Установено е влиянието на физическото състояние на чернодробни плазмени мембрани върху активността на мембранно свързания ензим ацил-СоА лизофосфатидилхолин ацилтрансфераза, участващ в цикъла деацилиране-реацилиране. Показано е, че инкорпорирането в мембранния слой на фосфолипиди, предизвикващи втечняване на мембраната, води до повишаване на ацилтрансферазната активност. Обратно – повишаването на структурната подреденост на бислоя, води до частично потискане на тази активност (№ 12).

В. Антитуморни агенти и третирания

22. Показано е, че специфични комбинации от антитуморните агенти диметилсфингозин и милтефозин проявяват синергично въздействие върху белодробни ракови клетки ускорявайки апоптотичните процеси. Резултатите създават възможност за разработване на нови терапии, които са ефективни срещу раковите клетки, но са щадящи за нормалните клетки (№ 102, 110). В търсене на по-ефективни методи за третиране е изследван ефекта на антитуморния агент епирубицин, доставен под формата на наночастици, като е демонстриран различен клетъчен отговор и вътреклетъчна локалицзация в третираните карциномни клетки (№ 97).

Г. Разработване на клетъчни биосензори

23.На базата на дългогодишния опит от изследване на клетъчните адхезивни контакти е разработен нов клетъчен биосензор за оценка на повърхностната биосъвместимост на нови материали, създадени за нуждите на репаративната медицина. Биосензорът представлява генетично манипулирани фибробласти, експресиращи два хибридни, флуоресцентно белязани белтъка от групата на адхезивните белтъци – тенсин и винкулин. Промените във взаимното разположение на тези хибридни белтъци по време на взаимодействието на биосензора с изследвания материал се използва като сензорен елемент за отчитане на биосъвместимостта. Разработеният биосензор е представител на нов тип биосензори, използващи като сензорен елемент топологичните характеристики на конститутивно експресиращи се клетъчни белтъци (№ 74, 98, 99 и патентна заявка 1).

Д. Получаване на линии от човешки ембрионални стволови клетки

24.След въвеждане на технологията за получаване на линии от човешки ембрионални стволови клетки от ембриони на стадии морула и бластоцист са получени и са охарактеризирани първите български линии от човешки ембрионални стволови клетки. Това прави България 25тата страна в света, разполагаща със собствени линии от човешки ембрионални стволови клетки (№ 72, 73, 80, 83, 88, 91, 100).

Е. Фотобиомодулация

25. Показано е, че облъчване на човешки кожни фибробласти със светлина с дължина на вълната 590нм забавя клетъчното остаряване чрез забавяне скъсяването на теломерите. Резултатите представят нов механизъм, обясняващ отдавна познатите позитивни ефекти на фотобиомодулацията (№ 109).

**ІІ. Приноси с методичен характер**

1. Създаден е методичен подход за селективно и регулируемо инхибиране на активността на малката ГТФаза Rac чрез използване на малки интерфериращи РНКи (siRNA) (№ 48 и 50).

2. Разработен е метод за изследване динамиката на два или повече интегринови рецептора едновременно, осъществяваща се по повърхността на клетките (№ 28 и 46).

3. Създаден е метод за околичествяване на фибронектиновия матрикс, продуциран от култивирани клетки без използване на радиоактивни изотопи (№ 40).

4. Разработена е методична схема за установяване динамиката на фосфорилиране и дефосфорилиране на киназата Akt при култивирани клетки чрез единичен експеримент и без използване на радиоактивни изотопи (№ 38 и 41).

5. Създаден е метод за получаване на триизмерни фибронектинови матрикси, които позволяват лабораторно изследване на клетки в *in vivo*-подобни условия (№ 29, 58, 62, 63, 69 и 77).

6. Създаден е метод за въвеждане на белтъци в култивирани клетки чрез електропориране. При използването на този метод 25% от третираните клетки продължават да се развиват нормално и запазват екзогенните белтъци в продължение на няколко митотични цикъла (№ 8).

7. Адаптиран е методът на Miller and Bakken (1972), създаден първоначално за проучване на транскрипционната активност на хроматина, за изследване ултраструктурната организация на цитоскелетни структури - невронални и кератинови интермедиерни филаменти (№ 2, 5, 6 и 11).

8. За пръв път е приложен успешно в България (1985г.) методът на имуноелектронна микроскопия, позволяващ установяване локализацията на антигени на ултраструктурно ниво (№ 3 и 18).



/чл. кор. проф. дбн Румен Панков/