БИОИНФОРМАТИКАТА - НАУКА НА НОВОТО ВРЕМЕ

Красимира Стоянова

*Институт по информационни и комуникационни технологии,
Българска академия на науките*

BIOINFORMATICS - THE SCIENCE OF MODERN TIMES

Krasimira Stoyanova

Institute of information and communication technologies, BAS

РЕЗЮМЕ

Целта на настоящата статия е да даде определение и понятия за широк кръг от лица какво е биоинформатиката, без да задълбава в дълбоките процеси, достъпни за разбиране от специалисти биоинформатици. Разгледани са съвременни софтуерни продукти, разработени за биолози, както и компютърни и математически клетъчни модели в областта на биоинформатиката.

Ключови думи: биоинформатика, протеомика, функционална геомика, софтуер за биолози

ABSTRACT

The article aims to introduce computer scientists to the new field of bioinformatics. This area has arisen from the needs of biologists to utilize and help interpret the vast amounts of data that are constantly being gathered in genomic research-and its more recent counterparts, proteomics and functional genomics. The topic covered include: descriptions of the current software especially developed for biologists, computer and mathematical cell models, and areas of computer science that play an important role in bioinformatics.

Keywords: bioinformatics, proteomics, functional genomics, current software for biologists

1. ВЪВЕДЕНИЕ

В края на 60-те и началото на 70-те от миналия век компютърната техника активно навлиза в биологията: по това време нараства тяхната памет, увеличава се скоростта на операциите, намаляват се размерите. По същото време се появяват голямо количество експериментални данни по биология, изискващи осмисляне и обработка. Например едва през 2003 г. с обединените усилия на учени от много страни в общи черти е прочетен човешкият геном (1).

По този начин в края на 20 и началото на 21 век се появява бурно развиващата се област от биомедицинската наука биоинформатика, която днес е вече на 30 г.

Биоинформатиката е свързана още с появяването си с натрупване на обширни експериментални данни. Особено значимо това натрупване става през 70-те години на 20 в. Информацията, получена в биологичните експерименти, била

значително по-голяма, отколкото са човешките възможности за запомнянето на факти и техния анализ. Възникнала необходимост от съхранение на бързо нарастващия обем информация. Първите няколко стотици разшифровани последователности на белтъци били публикувани в книга във вид на атлас. Също така вече в началото на 70-те год. разшифрованите последователности толкова нараснали, че техният обем било невъзможно да се публикува в книга. Станало ясно, че са нужни специални програми за сравняване на последователностите, тъй като човешкият мозък не би могъл да се справи с анализа на тази информация.

През 90-те г. настъпва разцветът на геномиката. Понастоящем са разшифровани пълните геномни последователности на човека, мишките, пилето, жабата, отделни видове риби, кръглия червей, няколко стотици видове вируси и бактерии и т. н. Прочитане генома на бактериите –

това е задача, по силите на групи от 2-3 изследователи за време, повече от година. Човешкият геном се състои от 3 милиарда букви, чийто еквивалент са 15000 книжни тома. А значението на дешифрирането му за биолозите можем да сравним с Менделеевата таблица за химиците.

Поради това за обработката на тази обширна биологическа информация на помощ идват компютърните технологии. Първият алгоритъм на подравняване на генната последователност бил предложен през 1970 г. Компютрите позволили да се съхранява информация във виртуални бази данни и да се оперира с тях с голяма скорост. Биоинформатиката, както и много други съвременни науки, се развиват успоредно с останалите науки: молекулярна биология, генетика, математика и компютърни технологии. Тяхната основна задача е разработка на изчислителни алгоритми за анализ и систематизация на данните за структурата и функциите на биологичните молекули, преди всичко нуклеиновите киселини и белтъците.

Обемът на генетичната информация, натрупана в базите данни, започва да се увеличава с нарастваща скорост, след като били разработени бързи методи на секвениране (разшифроване) на нуклеотидната последователност на ДНК. Постиганията на информатиката, лингвистиката и теорията на информацията правят възможен анализа на генетичните текстове. Взаимосвързаното развитие на биоинформатиката с други области на науката позволяват разчитане формирането на нов начин за възприемане на биологичните процеси, протичащи в клетките и организмите.

Като се отчете, че първият персонален компютър се е появил през 1981 г., а интернет – през 1991 г., т.е. съвсем неотдавна, то това е имало колосално значение за развитието не толкова на предмета на науката, колкото на нейната организация. Един от главните принципи на биоинформатиката (както и на останалите науки) е принципът на единното световно информационно пространство, обединяващо усилията на учениците от цял свят.

Какво е биоинформатиката

Историята на зараждането на биоинформатиката произхожда още от древни времена, а именно от 13 в. Младият италианец Леонардо от Пиза, известен в историята на математиката с името Фибоначи и знаменитите едноименни числа, описал решение на задачата с размножаването на зайци и построил първия математически модел на биологичен процес. А в 20-те години на 20

в. друг италиански математик Вито Волтер създал модел на съвместно съществуване на две биологични популации от типа „хищник-жертва”. След Втората световна война, в края на 40-те год. от миналия век, в биологията се появили математиката и физиката. Съвременната история на биологията започва през 1953 г., когато американските учени Уотсън и Крик открили двойната спирала на ДНК (2).

Фиг. 1. Двойната спирала на ДНК

Понастоящем съществуват различни определения за биоинформатика, но основно под термина се разбира използване на компютри за обработката на различен вид биологична информация. Днес терминът „биоинформатика” е значително разширен и **включва всяка реализация на математически алгоритми, свързани с**

биологични обекти, и информационно-комуникационни дисциплини, приети в биологичните изследвания. В биоинформатиката, както и в самата информатика, се използват методите на приложната математика, статистика и другите точни науки. Биоинформатиката се използва също така в биохимията, биофизиката, екологията, генетиката и ред други области на естествените науки (3).

Биоинформатиката включва в себе си: а) математически методи на компютърен анализ в сравнителната геномика (геномна биоинформатика); б) разработка на алгоритми и програми за прогнозиране пространствената структура на белтъците (структурна биоинформатика); в) изследване на стратегии, съответстващи на изчислителната методология, а също така и общо управление на биологичните системи.

Модерно сред съвременните учени е думата „биоинформатика“ да бъде съвсем отделна от молекулярната биология. Понастоящем съществуват множество определения и интерпретации. Да ги разгледаме подробно.

Едни говорят, че биоинформатиката – това е раздел от съвременната наука, занимаваща се с дешифриране на човешкия геном.

Според други биоинформатиката е системна биология, позволяваща разглеждането, изучаването и систематизирането на глобалната картина в биологията.

Трети смятат, че биоинформатиката е аналог на молекулярната биология с тази разлика, че молекулярната биология се занимава с научните изследвания, а биоинформатиката извършва изчисления и обработка на данни с помощта на мощни компютърни системи.

Според четвърти биоинформатиката – това е възможност по структурата на макромолекулите много бързо да бъдат намерени гени мишени и да бъдат създадени нови лекарствени препарати.

И всеки по своему е прав.

В практически смисъл биоинформатиката е приложна наука, обслужваща интересите на биолозите. Към областта на техническата биоинформатика се отнася първичната обработка на данните. Получените данни трябва да се съхраняват някъде, да бъдат обезпечени с удобен достъп и т.н. Значимо по сложност и интересно се явява заниманието на биоинформатиките: белтъкът А притежава такива и такива функции, ген Б се включва в тези условия и т. н. В това се състои и практическото приложение на биоинформатиката.

Биоинформатиката намира приложение в следните направления от биологическата наука:

- Геномика, транскриптомика и протеомика
- Компютърно моделиране в биологичното развитие
- Компютърен анализ на генните мрежи
- Моделиране в генетиката на популациите.

Биоинформатиката с лекота се вписва във фармакологията, позволяваща проектирането на препарати от 5-6 години до няколко месеца, а също така се интегрира с много други медицински и биологични науки.

Понастоящем съществуват следните раздели от биоинформатиката:

- Биоинформатика като цяло
- Клинична биоинформатика
- Структурна геномика
- Функционална геномика
- Фармакогеномика
- Клинична протеомика
- Функционална протеомика
- Структурна протеомика.

С помощта на методите на биоинформатиката е възможно не само да се обработват огромни масиви различни биологични данни, но и да се откриват закономерности, които не винаги могат да бъдат видени при обичайните експерименти, да се предсказват функциите на гените и зашифрираните в тях белтъци, да се строят модели на взаимодействия на гените в клетките, да се конструират лекарствени препарати.

Фиг. 2. Карта на X хромозоми на човека (от сайта NCBI). Сбор на човешкия геном – едно от великите постижения на биоинформатиката

2. ОСНОВНИ ОБЛАСТИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ В БИОИНФОРМАТИКАТА

Да разгледаме някои основни области за изследвания в биоинформатиката.

2.1. Анализ на генетичните последователности

След като през 1977 г. бил секвениран фагът Х 174, последователностите на ДНК в организмите били дешифрирани и съхранени в бази данни (4). Тези данни се използват за определяне последователността на белтъците и регулярните участъци. С нарастване количеството на данните станало невъзможно да се анализира последователността на свързване. В наши дни при търсене по геном на хиляди организми, състоящи се от милиарди двойки нуклеотиди, се използват компютърни програми.

Сглобяване на фрагменти ДНК може да бъде доволно сложна задача за големи геноми. Днес този метод се прилага практически за всички геноми, а алгоритмите за сглобяване на геноми се явяват един от големите проблеми на биоинформатиката в днешния ден. Обработката на огромно количество данни, получени при секвенирането, се явява една от важните задачи на биоинформатиката. Друг пример за прилагането на компютърния анализ на генетичните последователности е автоматичното търсене на гени и регулярните последователности в генома.

Фиг. 3. Обработката на огромни количества данни, получени при секвенирането, се явява една от важните задачи на биоинформатиката

2.2. Анотация на геноми

В контекста на анотацията на геноми – това е процесът по маркиране на гените и другите обекти в последователността на ДНК. Първата програмна система за анотация на геноми била създадена през 1995 г. от Оуен Уайт.

2.3. Изчислителна еволюционна биология

Еволюционната биология изследва произхода и появата на видовете, тяхното развитие във времето. Информатиката помага на еволюционните биолози в следните аспекти:

- изучава еволюцията на голям брой организми, измерва изменението на всички ДНК;
- сравнява цели геноми, което позволява да се изучат значим брой еволюционни събития;

- строи компютърни модели на популациите, за да предскаже поведението на системите във времето;
- следи появата на публикации, съдържащи информация за големи количества видове.

2.4. Оценка на биологичното разнообразие

Биологичното разнообразие на екосистемите може да бъде определено като пълна генетична съвкупност на определена среда, състояща се от всички обитаващи видове, независимо дали във водата или на сушата, или всяка биосфера на планетата Земя. Специализирано програмно обезпечение се употребява при поискване, визуализация и анализа на информацията и, което е особено важно, за предоставянето ѝ на други хора.

Разбираемо, биоинформатиката в съвременната научна биологична литература се среща като термин „изчислителна биология“. Счита се, че изчислителната биология – това не е област от науката, а подход към използването на компютрите за изучаването на биологичните процеси. Термините „биоинформатика“ и „изчислителна биология“ все още често се употребяват като синоними, въпреки че „изчислителната биология“ още указва разработката на алгоритми и конкретни изчислителни методи. Счита се, че не всяко използване на изчислителната биология се явява биоинформатика, например, математическото моделиране – това не е биоинформатика, въпреки че е свързано с решаването на биологични задачи.

Съществува още и математическа биология, която, както и биоинформатиката, също решава биологични задачи, но използваните при нея методи не се явяват числени и на тях не им трябва реализация в програмно или апаратно обезпечаване.

Отделно възниква структурната биоинформатика, към която се отнася разработката на алгоритми и програми за предсказване пространствената структура на белтъците. Биоинформатиката, в този си вид, влиза в раздела биология наред с анатомията, ботаниката, вирусологията, микробиологията, цитологията, палеонтологията, физиологията и т.н.

3. МЯСТО НА БИОИНФОРМАТИКАТА ПРИ БИОЛОГИЧНИТЕ ИЗСЛЕДВАНИЯ

Биоинформатиката анализира факти, които са получени в експерименталната биология. Получените данни експериментатор сравнява с целия набор, вече съдържащ се в базата данни. Когато той не намери в тази база откритата от него

последователност, той влиза и попълва самата база. **Като функция на базата се включва съхранение, систематизиране, обновяване на информацията и обезпечаване на достъп в нея. За тези операции са необходими огромни компютърни мощности.**

Съществуват също така бази данни на научните публикации на биологична тематика. Една от големите онлайн библиотеки на медико-биологични публикации PubMed съдържа повече от 16 млн. статии, публикувани през последните 50 години.

Интегралните бази данни и енциклопедии изпълняват важна функция да обединяват в себе си цялата известна информация за конкретен ген, белтък, организъм и т.н. Те обобщават информацията от голям брой други бази данни и постоянно се обновяват.

Изследователски цели, които си поставя биоинформатиката, са:

Анализ на геноми, търсене в тях на гени: Всеки нов прочетен геном представлява сам за себе си огромна последователност от повтарящи се в различна комбинация букви. Биоинформатиката позволява да се отделят гените в това текстово многообразие. Такава операция по отделянето на гена от генома се нарича маркиране на генома. Предсказване функциите на гените: Изясняването на функциите на всички гени по опитен път е достатъчно трудоемко. В този случай биоинформатиката помага те да се предскажат, базира се на сравнение с тези гени, чиито функции са вече определени.

Оценка ролята на отделните участъкови последователности във функционирането на белтъци: В молекулата на белтъка има участъци, отговорни за решаването на различни видове биологични задачи. Разпознаването на тези участъци с помощта на методите на биоинформатиката разшифрова широк спектър функции на конкретния белтък.

Построяване на молекулярни модели белтъци на основа тяхната последователност: Структурата на белтъка се определя по опитен път, например, облъчване на микроскопичен кристал, състоящ се от молекула на белтък, с рентгенови лъчи. Това е достатъчно дълъг и продължителен процес. Някои белтъци изобщо не могат да се анализират така, защото те нямат кристална структура. Биоинформатиката с помощта на компютърното моделиране помага да се създаде пространствен модел на белтъка, като вече известна структура на белтък е май-малко отдалечена от вече позната подобна последователност.

Изследване механизма на функциониране на макромолекули, изхождайки от тези модели: Важно е познаването на пространствената структура на молекулите, получена благодарение на метода на биоинформатиката. Може да предскаже как тя ще работи в бъдеще и как може да ѝ се повлияе. Компютърно конструиране на лекарства: Лекарства могат да се конструират, да се моделира в пространството взаимодействието на различни химични съединения с белтъци мишени. При това е необходимо да се сортират огромно количество съединения и да се изберат оптималните.

Анализ на информация: Съединяването на биология, химия, физика, математика и информатика позволява разностранно да се описва биологическата система. Използването на компютърните ресурси улеснява многократното ускоряване процеса на анализ и увеличава точността и скоростта на получените резултати.

Използване достиженията на информатиката: Новите открития в биологията с използване на технологиите на биоинформатиката бързо намират своето приложение в медицината, фармакологията, козметиката, биотехнологиите, селското стопанство, екологията и други области. Биоинформатиката самостоятелно дава резултати, има практическа стойност, а също и обезпечаваша условия за работа в различни области от биологията.

Основни технологии на биоинформатиката: Голяма част от работите по биоинформатика са концентрирани около технологиите, използването на бази данни за съхранение на биологическата информация. Тези данни могат да бъдат публични или частни. Особено важно се явява предоставянето на публичен достъп към такива бази данни чрез открити стандарти. Получава развитие използването на онтологията и логическите методи за обработка на биологическата информация и този подход е по-разпространен, отколкото използването на бази данни.

4. БИОИНФОРМАТИКАТА НА СЪВРЕМЕННИЯ ЕТАП

4.1. Развитие на биоинформатиката в света

През 20-21 век биоинформатиката се превръща в бурно развиваща се област в света на биомедицинската наука. Наред с изследователите на фундаментални разработки потребители на биоинформационните технологии се явяват медицинските, фармакологичните, биотехнологичните и учебните заведения. Тази област на нау-

ката е приоритетна както в САЩ, така и в останалите страни.

Количеството центрове по биоинформатика постоянно расте във всички страни от Европа, Азия, САЩ и Австралия. Наред с държавните, академичните и изследователските центрове по биоинформатика в последните години възникнаха значително количество организации и проекти, ориентирани в търговското използване на резултатите от изследванията в областта на биоинформатиката. Това са преди всичко организации, чиято дейност е ориентирана към структурния, функционалния и сравнителен анализ на генома, включително човешкия геном. Наред с приложението на вече създадените методи биоинформатиката интензивно развива техническата и програмната база за решаване на приложни задачи, особено във фармакологията. С бързи темпове се развива и индустрията на програмно обезпечаване за решаването на такива задачи.

4.2. Състояние на биоинформатиката в България

Биоинформатиката се отнася към интелектуалния, високотехнологичен раздел на науката, където получаваните резултати в значителна степен зависят от развитието на творческия потенциал на учените, но също така се влияят от техническото обезпечаване.

През 90-те год. на миналия век станало ясно, че в България е обучена достатъчно голяма „критична“ маса специалисти в областта на приложението на математическите методи в биологията. По това време се появило достатъчно голямо количество биологическа информация, обработката, осмислянето и анализа на която не би могъл да бъде възможен без помощта на компютърната техника. Всичко това е било предпоставка за възникването на новия отрасъл на биологическата наука – биоинформатиката.

Количеството публикации по биоинформатика в последните години стремително нараства. Работите в областта на биоинформатиката активно се печатали в 90-те год., но самите експерименти, описани в статиите, били проведени по-рано. База за реализацията на комплексния подход по проблема и написаните статии са многогодишните усилия на безброй изследователи. Първите работи по теоретичен анализ на аминокиселинната последователност на белтъка били публикувани в 50-те год. на миналия век.

През 1988 г. започнал проектът по разширяването на човешкия геном, поставил си за своя цел определянето на пълната последователност на ДНК, съставляваща човешките хромозо-

ми. Този проект на общите усилия на учените от цял свят бил завършен през 2003 г.

Да отбележим редица институти, където в България се извършват работи по биоинформатика.

В България водещи организации са Институтът по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ и Институтът по биофизика и биомедицинско инженерство към БАН. Те провеждат фундаментални и приложни изследвания в областта на молекулярната биология и сродни дисциплини като структурна и клетъчна биология, молекулярна генетика и биоорганична химия с цел приложението им в медицината и фармацията. Също така към научните институти с подобна тематика се отнасят следните: Институт по биология и имунология на размножаването, Институт по невробиология; Институт по микробиология; Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей.

Към всеки от водещите медицински университети в България съществуват обособени звена, занимаващи се с биомедицински и приложни изследвания като Центъра по молекулярна медицина към МУ-София, към медицинските университети във Варна, Плевен и т. н.

Това ново направление на науката се нуждае и от специалисти с нов профил. Поради това във водещите ВУЗ в България в учебните програми се появяват нови специалности като биоинформатиката. Тя се изучава като самостоятелна бакалавърска и/или магистърска програма например в СУ „Климент Охридски“, ПУ „Паисий Хилендарски“, ЮЗУ Благоевград и т.н. Студентите започват да изучават тази интересна и сложна наука, едно от направленията ѝ – молекулярната биология, която изследва молекулярните процеси, но не *in vitro*, а *in silico*, т.е. не вътре, а с помощта на компютъра.

5. ПРИМЕРНИ КОНКРЕТНИ ПРОГРАМНИ КОМПЛЕКСИ ПО БИОИНФОРМАТИКА

В системата на биологията важна роля играят методите на биоинформатиката. Те дават възможност с помощта на компютъра:

- да се натрупва и интегрира в бази данни експериментална информация;
- да се осъществява техният компютърен анализ;
- да се извършва математическо моделиране на структурно-функционалната организация на живите системи;
- да се предсказват новите свойства на живите системи;

- на тази база да се планират новите етапи на експериментални изследвания.

В този раздел се дават конкретни примери на бази данни и банки, базови пакети, програмни средства за пълен анализ на макромолекули, а също и други програмни продукти по биоинформатика с техните адреси в интернет, разработени, както от родни, така и от чужди учени: GenBank – база данни по нуклеотидна последователност (3 400 000 000 двойки, основани в 461 000 последователности) (8).

SWISS-PROT – аотирана база данни по аминокиселинна последователност на белтъци (9). **PIR** – аотирана база данни по аминокиселинна последователност на белтъци, организирани в съответствие с хомологията и таксономията (10). **PBD** – база данни за 3D структура на биологическите макромолекули (11).

NDB – база данни по нуклеинови киселини. Включва структури ДНК и РНК вместо с техните 3D изображения (12).

ProDom – база данни по домейни белтъци (13).

Уеб сървъри, предоставящи на ползвателите генетична информация, оборудвани с комплексни програмни средства при поискване на информация в базата данни и анализа на нуклеотидните и аминокиселинните последователности. За търсене в последователността в базата данни могат да се използват номенклатурните наименования на гените, организмите, ключови думи и т.н.

Съществуват също примерни основни програми за сравняване на аминокиселинни и нуклеотидни последователности като например: ACT (Artemis Comparison Tool) – геномен анализ; Arlequin – анализ на популационно-генетични данни; Bio Numerics – търговски универсален пакет програми по биоинформатика; FASTA – набор от алгоритми за определяне сходството на аминокиселинните и нуклеотидните последователности; Pop Gene – анализ на генетичното разнообразие на популациите.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Днес в биологията прохожда глобална смяна на модела на науката. Неотдавна експериментът потвърждавал или опровергавал тази или онази хипотеза. Днес вече биологията попада сред науките, които оперират с данни, получавани в промишлени мащаби. Използваните методи на биоинформатиката позволяват на учените да формират съдържателни изводи, които се базират на съпоставими разнородни данни или на обединено съгласувано наблюдение.

Въпреки че биоинформатиката като наука навърши 30 год., в нея все още съществуват традиционните направления: компютърен анализ на ДНК, РНК и белтъчната последователност, реконструкция на пространствената структура на биополимерите, теоретичен и компютърен анализ на структурно-функционалната организация на генома и белтъка. Биоинформатиката по своята същност е интегрирана наука, явяваща се инструмент в ръцете на тези, които се занимават с биология, молекулярна биология, молекулярна генетика, медицинска генетика, фармакология, а също и биохимия, биофизика и т. н.

Биоинформатика, геномика и протеомика – това са все науки за живота, модерни за началото на 21 в., така както молекулярната биология, имунологията и биотехнологията бяха модерни в края на 20 в. Не толкова отдавна биохимичите използваха цял живот, за да определят структурата на един белтък и покажат неговите функции. С помощта на методите на биоинформатиката може да се предскажат функциите на хиляди белтъци. В този вид в триадата геномика-протеомика-биоинформатика по същество са заложени все нови подходи към създаване на принципно нова медицина на бъдещето: нови методи на диагностика, нови лекарства.

Съвременното разбиране на биоинформатиката ни кара да мислим, че всички тези задачи, които до неотдавна се решаваха от биохимията и молекулярната биология посредством реални експерименти, в бъдеще могат да бъдат решавани с някаква степен на точност във виртуални компютърни експерименти и симулации.

ЛИТЕРАТУРА

1. http://web.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/index.shtml
2. Watson, J.D. и др. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. // Nature 171 (4356). 1953., с. 737–738.
3. <http://en.wikipedia.org/wiki/Bioinformatics>
4. Sanger, F.; Air, G. M.; Barrell, B. G.; Brown, N. L.; Coulson, A. R.; Fiddes, J. C.; Hutchison, C. A.; Slocombe, P. M.; Smith, M. (1977). „Nucleotide sequence of bacteriophage ΦX174 DNA“. Nature 265 (5596): 687–95.
5. www.ebi.ac.uk/ - сайт на Европейския институт по биоинформатика

6. www.ncbi.nlm.nih.gov – сайт на Националния център по биотехнологична информация на САЩ
7. http://en.wikipedia.org/wiki/biological_database
8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>
9. <http://www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html>
10. <http://www.nbrf.georgetown.edu/pir/searchdb.html>
11. <http://www.rcsb.org/pdb/>
12. <http://ndbserver.rutgers.edu>
13. <http://protein.toulouse.inra.fr/prodom.html>

Адрес за кореспонденция:

Красимира Стоянова
Институт по информационни и комуникационни
технологии
Българска академия на науките (ИИКТ-БАН)
София 1113, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 2, к-т 524
e-mail: kr.stoyanova@mail.bg