

**АВТОРСКА СПРАВКА ЗА ПРИНОСНИЯ ХАРАКТЕР НА НАУЧНИТЕ  
ТРУДОВЕ**

**НА ГЛ. АС. Д-Р ДЕНИЦА РУМЕНОВА ТЕОФАНОВА**  
*за участие в конкурс за заемане на академичната длъжност „Доцент”*  
*по 4.3. Биологически науки (Биохимия)*  
*обявен в ДВ бр. 24/16.03.2018 г.*

Приносите с научно-фундаментален и научно-приложен характер могат да бъдат разделени тематично в няколко направления:

**I. Приноси с научно-фундаментален характер**

1. Растителни хормони и участието им в симбионтни и паразитни взаимоотношения.
2. Биохимичен, функционален и секвенционен анализ на протеини
  - 2.1. Участие на ензими в соматичната ембриогенеза при растенията в условия на солеви стрес;
  - 2.2. Абиотичен и биотичен стрес – отговор и толерантност при растенията;
  - 2.3. Белтъчно профилиране на житни растения (2D-електрофоретично);
  - 2.4. Идентификация на специфични хелминтни протеини – структурни и функционални характеристики.
3. Молекулярно-таксономични, филогенетични и популационни изследвания при различни таксони;
  - 3.1. Използване на митохондриален контролен регион (D-loop) за популационен анализ при аборигенни български породи говеда;
  - 3.2. Използване на гени за млечни протеини за популационен анализ при съвременни и автохтонни български породи говеда;
  - 3.3. Молекулярно-таксономични и популационни анализи на биоразнообразието, еволюционния произход и разпространението при паразитни хелминти;

**II. Приноси с научно-приложен характер**

1. Биохимични характеристики на различни биомолекули и потенциала им за приложение в практиката.
  - 1.1. Протеинов и въглехидратен профил на кефирени напитки.
  - 1.2. Специфични хелминтни протеини като потенциални антигени при производство на ваксини;
  - 1.3. Хелминтни биологично активни вещества като инхибитори на клетъчната пролиферация;
2. Изготвяне на моделни системи за биохимични и молекулярно-биологични изследвания на паразитни растения.
3. Характеризиране на хранителните качества на житни.
  - 3.1. Валидиране на метод за таксономична принадлежност
  - 3.2. Изследване на *in vitro* храносмилането им;
  - 3.3. Имунологични предимства и недостатъци.
4. Приноси за селекцията на млекодайни говеда с цел подобряване на продукцията и икономическата ефективност.
  - 4.1. Изследвания на млечни протеини с цел подобряване технологичните свойства на кравето мляко;
  - 4.2. Изследване на корелацията между полиморфизмите в гените за млечните белтъци и качествените и количествени показатели на млякото; Препоръки за практиката.
5. Участие на ензими в соматичната ембриогенеза при растенията.

**I. Приноси с научно-фундаментален характер (Публ. I.1., I.2., I.9., I.16., II.1., II.2., III.1. III.2., III.4., IV.1., V.1., V.2., V.3., V.9., V.10., V.11., V.12., V.16, V.26., V.28., V.29., V.34., V.35., V.36., V.37., V.39., V.40., Секвенции VI.5., VI.6., VI.7., VI.8. VI.10., VI.11.)**

**1. Растителни хормони и участието им в симбионтни и паразитни взаимоотношения. (Публ. III.1.)**

Под формата на глава от книга (“Plant Tolerance to Environmental Stress: Role of Exogenous Phytoprotectants”) са обобщени наличните данни в съвременни литературни източници за стриголактоните като растителни хормони, като са засегнати както структурата и биосинтетичния им път, така и техните функции при междуорганизмовите взаимоотношения на растенията (симбионти, патогени и др.), включително в условия на абиотичен стрес. Стриголактоните са важни фитохормони с множество функции, както в развитието на растенията, така и като комуникационни молекули в почвата. Тяхната положителна роля като екзогенно прилагани вещества при растителния отговор на абиотичен и биотичен стрес може да бъде пряка или непряка, чрез арбускуларна микоризна симбиоза. Описан е също и потенциала за търговското приложение на стриголактоните. Последното до голяма степен е възпрепятствано от ниските им концентрации в коренови ексудати, което създава възможности за химичен синтез на техни аналози и производни. Приложението на стриголактоните би могло допълнително да бъде подобро чрез конкретно насочване и избягване на нежелани инфекции от кореновите паразитни растения от семейство Orobanchaceae.

**2. Биохимичен, функционален и секвенционен анализ на протеини Публ. I.16., II.1., III.2., IV.1., V.3., V.9., V.11., V.10., V.12., V.16. V.26., V.28., V.34., V.36., V.37., V.39., V.40., Секвенции VI.10., VI.11.)**

**2.1. Участие на ензими в соматичната ембриогенеза при растенията в условия на солеви стрес (Публ. V.16.);**

Изследванията на молекулните механизми на соматична ембриогенеза и влиянието на абиотичния стрес върху тях са в приоритетна за растителната молекулярна биология област и са с фундаментален характер. Соматичната ембриогенеза е специфичен процес, при който соматичните растителни клетки могат да формират ембриоиди в следствие на процеси на дедиференциация и повторна редиференциация, което превръща този процес в удобен модел за изследването на физиологичните и биохимичните аспекти на ранните етапи на развитие и пластичността на програмата за развитие при растенията. Прилагането му *in vitro* се използва широко в растителните биотехнологии. Този процес се разглежда като един от множеството разнообразни механизми на адаптация на растенията към променящата се околна среда (различните фактори на абиотичния стрес). Изследвани са ензимните активности в солево третиранни суспензионни ембриогенни култури на *Dactylis glomerata* L. и е потвърдено участието на открития изоензим на хитиназите с големина 32 kDa в процеса на соматична ембриогенеза в условия на абиотичен стрес. Тази изоформа отсъства в култури, третирани с 0.17M NaCl (инхибираща за соматичната ембриогенеза) и различния профил на хитиназните изоформи вероятно е свързан с инхибиране на соматичната ембриогенеза. Тези данни са представени на научен форум (Публ. V.16.) и за тях е подготвена публикация за реферирано списание.

**2.2. Абиотичен и биотичен стрес – отговор и толерантност при растенията (Публ. III.2., V.3., V.9., V.11., V.36., V.37.);**

Всяко изменение в условията извън оптималните предизвиква стресов приспособителен отговор. Растенията реагират на множество стресови фактори с различна природа, но от особен интерес е отговорът към солеви стрес, поради своето комплексно действие върху растителния организъм и поради своето широко разпространение (много обработваеми площи са засегнати или уязвими към засоляване поради високи концентрации на соли в почвите и ограничени водни ресурси). Засоляването предизвиква физиологични и метаболитни промени в растенията, които водят до морфологични изменения, забавен растеж и развитие, намалена интензивност на синтетичните процеси, и като цяло понижена жизнеспособност. Това от своя страна рефлектира в сериозни загуби на реколта от културни видове растения и представлява значим проблем за съвременното земеделие и като цяло за световната икономика. Една от възможностите за решаване на тези проблеми е селекцията на солево-толерантни сортове културни растения и изследванията в тази област са изключително интензивни. Въпреки това потенциалните молекулни маркери за стресова устойчивост са все още неясни, включително ролята им в толерантността и ефекта на стресовите фактори върху тях. Изследванията в посочените научни трудове включват разкриване на потенциала на антиоксидантни ензими и други метаболити като молекулни маркери за солева толерантност при пшеница и други житни култури и влиянието на стреса върху хидролитичните ензими при покълване (Публ. V.9., V.11., V.37.), ролята на ензимите от глутатион-аскорбатния цикъл в стресовата устойчивост (Публ. III.2.), ефекта на стресовите фактори върху антиоксидантните ензими при *Arabidopsis thaliana* в условия на комбинирано действие на абиотичен (солеви) и биотичен (инфекция с *Cuscuta campestris*) стрес (Публ. V.36.) и ефектите на образуване на гали при паразитни растения върху хидролитичните и антиоксидантни ензими (Публ. V.3.).

В глава от книга (“Drought Stress Tolerance in Plants”) са обобщени данните, налични в научната литература за ролята на аскорбат-глутатионовия цикъл и контрола на окислително-редукционна среда в отговора на засушаване. Разгледано е и участието на аскорбат-глутатионовия цикъл при ксерофитни и пойкилохидратните растения. (Публ. III.2.).

Изследвани са за първи път в сравнителен аспект антиоксидантни ензими при пшеница, камут, лимец и спелта, както и редица други биохимични показатели (хлорофили, пролин и др.) като потенциални молекулни маркери за солева толерантност. Пшеницата показва превъзходство по отношение на солевата толерантност спрямо все по-популярните в търговската мрежа древни житни култури. Показано е, че като потенциални молекулни маркери за стресова устойчивост при житни биха могли да се използват супероксид дисмутазите и пероксидазите, а натрупването на водороден прекис единствено при пшеница не е свързано с по-голяма чувствителност към солеви стрес ((Публ. V.9., V.11.). Освен представени на научни форуми, посочените данни са включени и като предмет на дипломна работа и вече са включени в публикация, подадена за публикуване (VII.1.).

При ечемика са изследвани профилите на разтворимите запасни белтъци и активността на протеазите в три различни анатомични части от семето при покълване на различни солеви концентрации. Показано е, че най-големи разлики се наблюдават на 24-тия час от покълването в проксималната част на ендосперма. На този час е най-висока и протеазната активност, която спада на 48-ми час особено при по-високи солеви концентрации (0,4M NaCl). Фундаменталните познания, че цялостната способност на семената на ечемик да покълнат до голяма степен зависи от мобилизацията на запасните протеини и се възпрепятства от по-високите нива на соленост и какви са те (Публ. V.37.) биха били както от екологична, така и от икономическа полза. Тези

изследвания са развити и допълнени по отношение и на резервните въглехидрати и са подготвени за публикуване.

За първи път е изследвано комбинираното влияние на абиотичен (солеви) и биотичен (инфекция с *Cuscuta campestris*) стрес върху *Arabidopsis thaliana*, като е проучвана активността на антиоксидантните ензими както в гостоприемника така и в паразитното растение. Установено е активирането на антиоксидантните ензимни системи на гостоприемника пропорционално на солевата концентрация и на близостта до инфекцията с паразита. Детектирано е също и диференциалното повлияване на тези ензими при гостоприемника и паразита, вероятно дължащо се съответно на видовите особености и паразитния начин на живот. Изследвана е и концентрацията на хлорофили и съотношението хлорофил a:b на растението гостоприемник, която се повлиява негативно както от повишените соли концентрации, така и от присъствието (дори изразено) на паразитното растение. Посочените данни са от фундаментално значение за изследванията на взаимоотношенията паразит-гостоприемник, особено в неблагоприятни условия и биха могли да обогатят и детайлизират информацията, налична за тях, която е доста оскъдна в съвременната литература. Те са включени в дипломна работа и са подготвени за публикуване. (Публ. V.36.).

За първи път са изследвани метаболитните особености при гали, формирани от *Smicronyx* sp. върху *Cuscuta campestris*. Установено е, че те са метаболитно активна и диференцирана част от стъблото на паразитното растение, притежаващи повишени нива на хидролитичните ензими (вероятно с цел по-добро изхранване на ларвата) и не индуцират значителен антиоксидантен отговор при паразита. Данните са представени на научен форум, включени са в предстояща дипломна работа и са подадени за публикуване (Публ. VII.3.).

### **2.3. Белтъчно профилиране на житни растения (2D-електрофоретично) (Публ. IV.1., V.10., V.12.);**

Житните култури заемат централно място в съвременното земеделие и осигуряват по-голяма част от производството на храна и фуражи. В световен мащаб пшеницата е водеща в селскостопанското производство. Понастоящем двете основни разновидности на промишлено произвежданата пшеница са зимна (*Triticum aestivum*) и твърда пшеница (*Triticum durum*). Еднозърнестият лимец (*Triticum monococcum*), спелтата (*Triticum spelta*) и камута (*Triticum turanicum*) са от първите форми пшеница, култивирани преди около 11 000 години. Най-новите съвременни тенденции за подобро качество на живот и здравословно хранене се основават на повторното въвеждане на тези древни зърнени храни в диетата, поради тяхното високо съдържание на витамини, протеини, минерали, мазнини и масла, по-голяма част от които се запазват при хранене, в контраст с ниско съдържание на глютен и високо съотношение на протеин към скорбяла. Смята се, че това е тяхно предимство поради това, че високото глютенено съдържание е една от причините за появата на все по-остри форми на хранителни алергии. Приносите на научните трудове в тази насока са свързани с характеризиране на белтъчния профил на резервни белтъци от пшеница, камут, спелта и лимец. Чрез 2D електрофорези са показани глютените им фракции и е установено сходство в профилите на пшеницата и спелтата и известни разлики при останалите. (публ. V.56).

### **2.4. Идентификация на специфични хелминтни протеини – структурни и функционални характеристики (Публ. I.16., II.1., V.26., V.28., V.34., V.38., V.39., V.40., Секвенции VI.10., VI.11.).**

Голяма част от хелминтните белтъци са специфични за близкородствени таксони, имат огромно значение за ключови метаболитни процеси при тях и детайлното им охарактеризиране допринася за по-доброто разбиране на взаимодействията паразит – гостоприемник. Високата им специфичност дава и допълнителни възможности да бъдат използвани като потенциални цели за бъдещи разработки с терапевтична насоченост.

За първи път при паразитния нематод *Trichinella spiralis* е изолиран, характеризирани и секвенирани нов белтък (*Ts*-PCNTP), уникален за представителите на разряда и представител на ново протеиново семейство полицистеинови протеини. Той вероятно е с функция за съхранение и/или транспорт на метали благодарение на наличието на два уникални полицистеинови домена и естествено присъстваща хистидинова опашка, за които са доказани метал-свързващи свойства ( $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  и  $Ni^{2+}$ ). Имунохистохимично е доказана неговата експресия и екстрацелуларна локализация във всички тъкани без екскретиране извън паразита. За първи път в България е приложен метод за кристализиране на рекомбинантния вариант на този белтък, което би подпомогнало изясняването на третичната структура.

При *Fasciola hepatica* е описан по същия начин както при *Trichinella spiralis* и специфичен липид-свързващ белтък (FABP3). Информацията от структурния и функционалния му анализ би могла да бъде използвана при разработка на препарати за противопаразитна профилактика.

**3. Молекулярно-таксономични, филогенетични и популационни изследвания при различни таксони (Публ. I.1., I.2., I.5., I.6., I.9., I.7., I.11., I.14., II.2., III.4., V.1., V.2., V.13., V.15., V.17., V.19., V.20., V.25., V.29., V.35., Секвенции VI.5., VI.6., VI.7., VI.8., VI.9.);**

**3.1. Използване на митохондриален контролен регион (D-loop) за популационен анализ при аборигенни български породи говеда (Публ. I.5., I.6., V.13., Секвенции VI.9.);**

Млекодайнните породи говеда са от голямо значение за българското селско стопанство и хранителната индустрия. Освен това в България има представители на вида *Bos taurus*, аборигенни за Балканския полуостров и съответно представляващи ценен генетичен ресурс за запазването на генофонда и биоразнообразието им - Българското сиво и Късорогото родопско говедо. Освен това в исторически план страната ни е и кръстопът за разпространението и одомашняването на различните породи говеда. Поради тези причини, информацията за популационните структури на тези породи говеда е от фундаментално значение за изясняване на статуса им в България, в европейски и световен мащаб, и допринася за изготвянето на стратегии за тяхното съхранение и защитата им от изчезване.

Българско сиво и Късорогото родопско говедо за първи път са генотипирани по отношение на митохондриалния контролен регион (D-loop регион) и са установени 18 хаплотипа. Хаплотипният профил на тези автохтонни говеда е показан като специфичен за балканските породи. Дефинирана е характерна за хаплотиповете при породата Късорогото родопско говедо полиморфна позиция 173G от D-loop региона, която е представена с изключително висока честота (50%), което е наблюдавано единствено при португалски и китайски популации. Основано на тези данни е направена хипотеза за вероятно древен произход и одомашняване на това говедо, като част от брахицерните популации. При Българското сиво говедо хаплотипният профил е различен. Установени са два основни хаплотипа. Единият (BGC 4.1) е с честота на

срещане 33% и е част от доминантния за европейските популации T3a хаплотип. Вторият е BGC 4.2 (с честота 41%) и е нов характерен хаплотип, дефиниран за Балканите. На базата на тази информация се предполага по-късния произход и разпространение на популациите на Българското сиво говедо спрямо Късорогото родопско говедо, както и различен териториален произход. Тези изследвания за първи път установяват наличието на T1 и T2 хаплогрупите на Балканския полуостров. Те са с произход от Мала Азия, разпространени съответно главно в Африка и Азия. Наличните в литературата данни показват наличието им само на Апенинския и Иберийския полуострови в Европа. Това показва потенциалното им по-късно разпространение от центъра на одомашняване от T3 хаплогрупата.

**3.2. Използване на гени за млечни протеини за популационен анализ при съвременни и автохтонни български породи говеда (I.7., I.11., I.14., V.15., V.17., V.19., V.20., V.25.);**

Популационен анализ на Българското сиво и Късорогото родопско говедо е направен за първи път в България и на базата на автозомните гени за млечни протеини ( $\alpha$ S1-казеинов ген (*CSN1S1*) и  $\kappa$ -казеиновия ген (*CSN3*)) чрез PCR-RFLP анализ с цел генотипирането и установяване на произхода, одомашняването и биогеографията им. И при двете популации е установена доминантността на честотата на В алела по отношение на полиморфизмите както в *CSN1S1*, така и в *CSN3* гена. Двете популации са с генотипен профил, сходен с този при Южноевропейските популации говеда (*CSN1S1*\*C - *CSN3*\*B), което е с потвърдителен характер по отношение на данните, получени от митохондриалния контролен регион. Тази информация би могла да се интерпретира чрез по-ранното одомашняване на кравите в тези региони на Европа (Неолит) и допълнителното интродуциране на средиземноморски популации през последните 2000 - 3 000 г.

**3.3. Молекулярно-таксономични и популационни анализи на биоразнообразието, еволюционния произход и разпространението при паразитни хелминти (Публ. I.1., I.2., I.9., II.2., II.5., III.4., V.1., V.2., V.29., V.35., Секвенции VI.5., VI.6., VI.7., VI.8.);**

Заболяванията причинени от паразитни хелминти са проблем както за ветеринарната, така и за хуманната медицина. Водят и до сериозни загуби за икономиката и селското стопанство. Едно от тях е фасциолозата, причинена основно от трематода *Fasciola hepatica* (голям чернодробен метил; Linnaeus, 1758). Среща се предимно при преживните животни, но се натрупват все повече доказателства за високия риск от инвазия и при хората. За този паразит основно изследванията са насочени към мерките срещу него (напр. антихелминтни препарати) и борбата срещу повишената устойчивостта на паразита към различните терапевтични и профилактични препарати. Тези проучвания могат само да се обогатят и подпомогнат от натрупване и детайлизиране на информацията за популационната структура, еволюционната история, генетичното разнообразие и филогенетичните вътре- и междувидови взаимоотношения между представителите на *Fasciola hepatica*. По тази причина посочените научни трудове разглеждат хомогенността и/или хетерогенността на тези популации, както и географското им разпределение и допълнително изясняват вътревидовата генетична структура на популациите на големия чернодробен метил в Източна Европа и установяват филогенетичния им статус в световен план. За целта са използвани ядрени и митохондриални генни региони.

Чрез SNP (Single-nucleotide polymorphism) анализ след директно секвениране са анализирани популациите на *F. hepatica* от Гърция, България и Полша. При тях за първи път са анализирани ядрени (28S рДНК и  $\beta$ -тубулин 3) и митохондриални (цитохром оксидаза 3, тРНК за хистидин и цитохром b) генни региони. Генотипирането на чернодробния метил разкрива специфичен генотипен и хаплотипен профил. 28S рДНК региона е надежден за потвърждаване на таксономичната принадлежност към вида, а на базата на полиморфизъм в специфичната 105-та нуклеотидна позиция е възможно отнасянето на представителите към конкретна линия в популациите. Въз основа на 21 вариабилни позиции от избраните мтДНК региони са дефинирани две линии – повсеместно разпространената StCmt1 и StCmt2, съдържаща филогенетично значими хаплотипове, уникални за конкретни (северни и/или южни) популации. Това е от значение и при дефинирането на еволюционния произход и за диференцирането на различните популации. За първи път е направен и сравнителен анализ на различни гени и е направена оценка на потенциала им като молекулни маркери при популационни и филогенетични изследвания за *F. hepatica*. За първи път е предложен и вариант за генетично разграничаване между северните и южни популации на големия чернодробен метил в Европа. Изказана е и хипотеза за възможното разпространение на този паразит като вероятно на Балканския полуостров е било налично по-голямо биологично разнообразие с последващо разселване в северна посока и интродукция на източни (азиатски) популации в Централна и Източна Европа след последния ледников период.

Често определянето на принадлежността на хелминтите към определени таксони е затруднено и морфологичните методи не са достатъчно ефективни. Тогава молекулярно-таксономичните техники биха могли да допринесат за изясняването на статуса на определени представители. Това е направено за детекция и диференциация при нематодите от род *Haemonchus* чрез PCR-RFLP от три морфологично различни проби. Сравнението на рибозомалните гени от различните видове показва ниска степен на вариации в рибозомалните ITS участъци и видовете от трите изследвани проби, макар и морфологично различни показваха идентична принадлежност към вида *Haemonchus contortus*. Възможно е в бъдеще този метод да се установи като диагностичен.

Проблемите и възможностите за избягването им при молекулярно-таксономични, еволюционни и филогенетични анализи, както и подробно описание на предимствата и недостатъците на прилаганите методики бяха обобщени в глава от книга („Genetic Diversity / Book 4“).

**II. Приноси с научно-приложен характер (Публ. I.3., I.4., I.8., I.10., I.12., I.13., I.15., I.17., II.3., II.4., II.6., II.7., III.3., IV.2., V.4, V.5., V.6, V.7., V.8., V.14., V.18., V.21., V.22., V.24., V.30.-32., V.33., Секвенции VI.1.-4.).**

**1. Биохимични характеристики на различни биомолекули и потенциала им за приложение в практиката. (Публ. I.3., I.13., II.3., V.21., V.24., V.33.).**

**1.1. Протеинов и въглехидратен профил на кефирени напитки (Публ. I.3.).**

В търговската мрежа често се откриват ферментирани напитки като кефира, поради популяризирането на положителните им здравословни ефекти. Често те се подготвят и в домашни условия от сурово мляко, което е възможно да доведе до възникване на различни състояния (напр. алергични) особено при липсата на качествен контрол. Поради това верифицирането на бърза и лесна техника за

изследването на хранителните качества на подобен род напитки е от голямо значение.

Двумерна белтъчна електрофореза се използва за сравнение на протеиновите профили на различни етапи от процеса на ферментация на кефирените напитки. Въглехидратният профил се изследва чрез тънкослойна хроматография. И белтъците, и въглехидратите са определени количествено с колориметрични методи. Получената напитка показва сходство в свойствата с търговски достъпния кефир, но не са намерени галактоза или други монозахариди дори след 36 часа инкубация, което предполага различни свойства. Това проучване показва ефикасна и евтина методология за характеризиране на ферментирани млечни продукти при необходимост от качествен контрол.

### **1.2. Специфични хелминтни протеини като потенциални антигени при производство на ваксини (Публ. I.13., V.24., V.33.);**

Заболяванията, причинени от паразитни хелминти са сериозен проблем и изследванията са насочени основно към мерки срещу развитието и размножаването на паразитите (напр. антихелминтни препарати) и борбата срещу повишената устойчивостта на паразита към различните терапевтични и профилактични препарати. Именно поради увеличаващите се данни за резистентност към редица антихелминтни препарати възниква необходимостта от откриване на алтернативни терапии. Едни от прицелните молекули за изследвания са специфични хелминтни протеини. Такива са например липид-свързващите белтъци. Те участват в метаболизма на различни липофилни лиганди и имат роля във физиологичната активност, метаболизма и разпределението на основни хидрофобни съединения (мастни киселини, фосфолипиди, ейкозаноиди, ретиноиди и др.), които са важни молекули, участващи в редица клетъчни процеси, включително генна транскрипция, имунни отговори и др. Има много данни, че такива белтъци причиняват антигенни и алергични реакции. Като потенциални антигени, те са и добри кандидати за създаване на ваксини. В тази връзка, подробно е проучен, секвениран и характеризиран както нативния, така и произведения рекомбинантен липид-свързващ белтък от *Fasciola hepatica* FABP3 като потенциален антиген за създаване на ваксина. Поликлонално антитяло е произведено срещу рекомбинантния FABP3 и тествано на нативния. Протеомните изследвания на различни такива белтъци от *F. hepatica* показват, че само FABP3 се екскретира върху повърхността на тялото *in vivo*. Това дава възможност да се изследва ефективността на нативния и рекомбинантния FABP3 като имунотерапевтичен агент и дали би могъл да се използва за имунопрофилактика. Търговски продукт на базата на FABP3, като антиген би могъл да намали паразитната трансмисия и продуцирането на яйца.

### **1.3. Хелминтни биологично активни вещества като инхибитори на клетъчната пролиферация (Публ. II.3., V.21.);**

Има налични данни, че при редица туморни образувания, туморния растеж се потиска при експериментално индуцирани хелминтози (фасциолоза, трихинелоза и нипостронгилоидоза). Поради тази причина е възможно някои биологично активни вещества от хелминти да имат инхибиращ ефект върху клетъчната пролиферация. За това са проучвани и частично биохимично характеризирани новоизолирани термостабилни биологично активни вещества от черен дроб на здрави и инвазирани с *Trichinella spiralis* плъхове като инхибитори на клетъчната пролиферация. С помощта на SE-HPLC са разделени двата вида биологично активни вещества като от



черен дроб на здрави пълхове са установени три фракции – 66618 Da, 20079 Da и 8063 Da. Две фракции са от черен дроб на инвазирани с *T. spiralis* пълхове – 66056 Da и 14791 Da. Тези фракции термостабилни биологично активни вещества биха могли да бъдат сравнени по действие и да бъдат потенциално използвани за инхибитори с висока ефективност в резултат на променения метаболизъм на чернодробните клетки и имунитета на инвазията с *T. spiralis* гостоприемник по време на паразитната инвазия. Необходими са изследвания и тестване при различни туморни клетъчни линии.

## **2. Изготвяне на моделни системи за биохимични и молекулярно-биологични изследвания на паразитни растения (Публ. V.6, V.7.).**

За първи път е оптимизирана и приложена е моделна система за изследване на взаимоотношенията между гостоприемникови и паразитни растения, включително в условия на абиотичен стрес с цел биохимични и молекулярно-биологични проучвания на комбинираното влияние на биотичен и абиотичен стрес. Установено е, че *Eutrema halophilum* е подходящ гостоприемник за видовете както от род *Orobanche*, така и на *Cuscuta*. Засоляването повлиява отрицателно паразитните растения, като ефектът се наблюдава в по-малка степен в толерантни към солта в сравнение с чувствителни към солта гостоприемници. Установено е, че *Arabidopsis* / *Eutrema* е подходяща потенциална система и за по-комплексни изследвания на отговора към солеви стрес в паразитни растения.

## **3. Характеризиране на хранителните качества на житни (Публ. V.4, V.5., V.8., Секвенции VI.1.-4.).**

### **3.1. Валидиране на метод за таксономична принадлежност (Секвенции VI.1.-4.);**

Валидиран, оптимизиран и успешно е приложен метод за доказване на таксономичната принадлежност на семена от различни видове житни от род *Triticum*, придобити от търговски достъпни източници. Използвани са рибозомални ДНК генни региони (ITS1 и ITS2) като молекулни маркери след PCR и SNP анализ след директно секвениране.

### **3.2. Изследване на *in vitro* храносмилането им (Публ. V.5., V.8.);**

Житните културни растения, макар и с висока представеност в човешката диета водят до сериозни здравословни проблеми поради имуногенността и алергенността на глутеновите фракции, предизвикващи множество състояния като целиакия, глутенова непоносимост, WIEDA и др. Заместването на хлебната пшеница (*Triticum aestivum*) с древни житни култури като камут (*Tr. turanicum*), спелта (*Tr. spelta*) и лимец (*Tr. monoccosum*) носи в себе си потенциал за минимизиране на споменатите здравословни ефекти. Приносите на научните трудове в тази насока са базирани на предположението, че част от проблемите са свързани с непълното храносмилане на резервните белтъци от споменатите култури и хлебни изделия, подготвени от тях. Това е проверено чрез двойна *in vitro* протеолиза с пепсин и панкреатин на белтъците от брашна и хлебни изделия, приготвени от четирите представителя на род *Triticum*, последвана от двумерна белтъчна електрофореза. При пшеница се наблюдава най-пълна протеолиза, което я прави потенциално най-слабо имуногенна (най-малко белтъчни фракции след храносмилане, които биха могли да имат имуногенен или алергенен ефект), което контрастира с идеята за заместване ѝ с нейните древни родственици.

### **3.3. *Имунологични предимства и недостатъци (Публ. V.4).***

Допълнително са изследвани някои характеристики на гореспоменатите житни култури, които биха имали значение при дефинирането на техните имунологични предимства и недостатъци. Установеното при изследванията на белтъчния профил на житни ниско съдържание на  $\alpha$ - и  $\gamma$ -глиадини в хлебни изделия, приготвени от лимец, предполага неговият по-нисък алергенен потенциал по отношение на заболявания като целиакия, а най-ниската представеност на  $\omega$ -глиадините при пшеница и спелта ги определя като най-слабо имуногенни по отношение на заболявания като WIEDA.

В допълнение с помощта на фагов дисплей са селектирани поликлонални фагови антитела срещу пшенични белтъци, които са доказани като крос-реактивни срещу останалите три култури, което предполага сходен алергенен потенциал. Изследванията с тези антитела за крос-реактивността, както при брашна, така и при хлебни изделия от тези житни култури дава възможност да се предположи, че пациенти, сенситизирани и произвеждащи антитела срещу белтъци от брашна (напр. пекари) е възможно да проявяват и хранителни алергии към хлебни изделия, получени от същите култури. Също така е показано, че пълната ензимна хидролиза на пшенични белтъци (спомената в т. II.3.2.) намалява или елиминира алергенния им потенциал, което при физиологични условия е силно компрометирано от влиянието на множество фактори, способстващи проявата на алергични реакции.

Тези изследвания са подходящи за оценка и за определянето на потенциала на различни култури като алтернативни заместители на пшеницата в диетата дори като диагностична техника.

#### **4. *Приноси за селекцията на млекодайни говеда с цел подобряване на продукцията и икономическата ефективност (Публ. I.4., I.8., I.10., I.12., I.15., I.17., II.4., II.6., II.7., III.3., IV.2., V.14., V.18., V.22., V.30.-32.).***

##### **4.1. *Изследвания на млечни протеини с цел подобряване технологичните свойства на кравето мляко (Публ. I.8.);***

Отглеждането и селекцията на млекодайни породи говеда е от изключително значение за съвременното животновъдство в страната ни. Не по-малко важно за икономиката и селското стопанство е и добива и качеството на млякото при производство на млечни произведения. По тези причини редица автохтонни и съвременни породи говеда в България са изследвани във връзка с установяването на корелация между генетичните варианти на млечните протеини и редица качествени и количествени показатели на млякото. Информация за това би допринесла значително за селекционната програма, запазване или подобряване на генетичното разнообразие, както и за подобряване на продукцията и икономическата ефективност в говедовъдството.

За първи път в България е оптимизирана и приложена успешно техниката на динамично светоразсейване (Dynamic Light Scattering, DLS) за определяне големината на казеиновите мицели в млечни проби. Потърсена е и корелация между установени вече различни генотипове по капа-казеиновия ген и големината на мицела, която при AA генотип е значимо (около 30%) по-висока от тази при AB и BB генотиповете. Получените данни биха могли да се използват за подобряване на технологичните свойства на кравето мляко, както и за повишаване на добива на

сирене, кашкавал и други млечни произведения. Могат да бъдат включвани и при изготвянето на селекционните стратегии на млекодайни породи говеда.

**4.2. Изследване на корелацията между полиморфизмите в гените за млечните белтъци и качествените и количествени показатели на млякото; Препоръки за практиката (Публ. I.4., I.10., I.12., I.15., I.17., II.4., II.6., II.7., III.3., IV.2., V.14., V.18., V.22., V.30.-32.).**

За първи път в България е провеждано такова изследване на връзката между генетичните полиморфизми по редица гени ( $\beta$ -лактоглобулин,  $\alpha$ S1- и  $\kappa$ -казеин) и показателите на кравето мляко (млечна продуктивност, млечно масло и др.). Изследванията включват редица български породи говеда. Получените резултати дават възможност за изграждането на икономически изгодни, лесни и ефективни програми за селекция на породи с по-голям добив и по-високо качество на млякото, както и за подобряване на породите чрез подбор на подходящи животни за размножаване с желаните характеристики на млякото. В методично отношение тези изследвания включват две основни техники – PCR-RFLP анализ и идентифициране на изоформите на млечните протеини чрез двумерна електрофореза. Установени са генотиповете в различни породи и честотата им на срещане. Дефинирано е и влиянието им върху различните изследвани показатели на млякото, като то не винаги е еднозначно при различните гени, но е с голяма икономическа значимост. При различни породи различни генотипове дори на един и същи ген са с по-силен ефект върху определени показатели на млякото (напр. за млечна продуктивност при Българско родопско говеда важи АВ>>ВВ генотип, а при Българско черношарено говеда АА>>АВ). Данните от PCR-RFLP анализа се потвърждават и от резултатите от двумерните електрофорези за преобладаващите генотипове по съответните гени за млечни протеини. Тези различия налагат индивидуален подход при изготвяне на програмите за развъждане и селекция при всяка конкретна порода, но представляват лесен и бърз диагностичен метод с голямо икономическо значение.

**5. Участие на ензими в соматичната ембриогенеза при растенията (Публ. V.16.).**

В методично отношение за първи път е приложена техника за електропренос от полиакриламиден гел върху полиакриламиден гел със субстрат с цел коректното определяне на молекулна маса на хитинази за преодоляване на разликите при електрофоретичното изместване поради свързване на ензимите със субстратите.

05.2018 г.

София



/гл.ас. д-р Д. Теофанова/