

Резюмета на работите на Стоян Александров Чакъров,
на Стоян Александров Чакъров, кандидат в конкурса за професор по
шифър 4.3. биологически науки (приложна молекулярна и клетъчна
биология); обявен в ДВ, бр. 44 от 29. 05. 2018 г.

С √ са обозначени публикации, които са били включени в дисертационния труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор”.

I. Статии в списания

1. С. Чакъров, Е. Грънчарова, И. Минков (1987). Влияние ионов магния на инхибиране АТРазного (АТР-синтетазного) комплекса митохондрии азидом. Биохимия 52, 12, 2029-2032.

Chakurov S, Grancharova E, Minkov I. [Effect of magnesium ions on the inhibition of the mitochondrial ATPase (ATP-synthetase) complex by azide]. Biokhimiia. 1987 Dec;52(12):2029-32.[Article in Russian]

С. Чакъров, Е. Грънчарова, И. Минков (1987). Влияние на магнезиевите йони за азидното инхибиране на АТФ-азния (АТФ-синтетазния) комплекс на митохондриите. Биохимия 52, 12, 2029-2032.

Изследвано е влиянието на азида върху АТФ-азната активност и окислителното фосфорилиране, катализирано от интактни митохондрии от черен дроб на плъх. Изследването показва, че в отсъствие на екзогенно добавени магнезиеви йони азидът инхибира както АТФ-азната активност, така и окислителното фосфорилиране. В присъствие на екзогенно добавени магнезиеви йони азидът инхибира обратната реакция (хидролиза на АТФ), но не оказва влияние върху реакцията на фосфорилиране. Направен е изводът, че едностранчивото действие на азида върху активността на АТФ-азния (АТФ-синтетазния) комплекс на митохондриите се осъществява с участието на магнезиеви йони, под влиянието на които комплексът преминава от форма, чувствителна към азид, към форма, която не е чувствителна към него. Показано е също така, че инхибиращото действие на азида зависи от концентрацията на екзогенно добавените магнезиеви йони.

2. М. Динева, S. Chakurov, Е. Bratovanova, I. Devedjiev, D. Petkov (1993). Complete template directed enzymatic synthesis of a potential antisense DNA containing 42 methylphosphodiester bonds. Bioorg. Med. Chem., 1, 6, 411-414.

М. Динева, С. Чакъров, Е. Братованова, И. Деведжиев, Д. Петков. (1993). Ензимно катализиран синтез по матрица на потенциална антисенс-ДНК с пълна дължина, съдържаща 42 метилфосфодиестерни връзки. Bioorg. Med. Chem., 1, 6, 411-414.

P^{α} -метилтимидинтрифосфат беше получен чрез пирофосфоролиза на P^{α} -метилтимидиндифосфат- P^{β} -дифенилестер. P^{α} -метилтимидинтрифосфатът беше подложен на изпитания като алтернативен субстрат за ДНК полимераза I на E. coli (Klenow фрагмент) чрез използване на няколко системи матрица-праймер, изискващи образуване на от 1 до 42 метил-фосфонодиестерни връзки. Ензимът катализира инкорпорацията на P-метилтимидилов остатък със (Sp-) конфигурация на едно място в 3' – края, както и на множествени места в нарастващата верига от 167 нуклеотида.

Наблюдавана беше синтеза на продукт с пълна дължина, съдържащ 42 места на инкорпорация на метилфосфонат.

3. S. Tafrov, S. Chakarov, P. Venkov (1993). Localization of EEN1 gene on chromosome II of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Compt. Rend. Bulg. Acad. Sci.* 46 (4) 121-123.

С. Тафров, С. **Чакъров**, П. Венков (1993). Определяне на физическото място на локуса на гена EEN1 върху хромозома II на низшата гъбичка *Saccharomyces cerevisiae*. *Compt. Rend. Bulg. Acad. Sci.* 46 (4) 121-123.

Генът EEN1 кодира продукт, чиято функция е свързана с определянето на клетъчната проницаемост при *Saccharomyces cerevisiae*. Мутацията *een1* е свързана с повишена проницаемост на клетката за различни вещества, за които *Saccharomyces cerevisiae* от дивия тип не са проницаеми. Механизмът на тази повишена склонност към поемане на вещества от външната среда е най-вероятно ендоцитоза в течна фаза, която се извършва на по-високи нива в мутантните *een1* клетки в сравнение с изогенните щамове див тип. Наскоро генът EEN1 беше изолиран чрез комплементация на мутацията *een1*. Клонирането на гена EEN1 направи възможно намирането на физическото място на локуса на гена върху една от хромозомите на *Saccharomyces cerevisiae* чрез хибридизационен анализ по Southern. Методологията, използвана в настоящото изследване се основаваше на разделяне на цели дрождеви хромозоми чрез гел-електрофореза с обръщане на полето (field inversion gel electrophoresis, FIGE) в буферната система TAFE на Beckman. От резултатите, получени в проведеното изследване може да се направи заключението, че генът EEN1 е разположен на хромозома II на *Saccharomyces cerevisiae*. Към момента се извършва анализ чрез използване на класическа дрождева генетика с цел прецизно картиране на EEN1 гена спрямо известните генетични маркери върху хромозома II на *Saccharomyces cerevisiae*.

4. Z. Kalvachov, S. Chakarov, L. Chakalova, A. Alexandrov, O. Georgiev, N. Nikolaev (1994). DNA probes for diagnostics of Hepatitis B virus. *Ann. Univ. Sofia*, 83/86, 4, 5-9.

Златко Кълвачов, **Стоян Чакъров**, Люба Чакалова, Александър Александров, Олег Георгиев, Николай Николаев (1994). ДНК сонди за диагностика на инфекции с хепатит В вирус. *Ann. Univ. Sofia*, 83/86, 4, 5-9.

Въз основа на наши предходни конструи бяха подготвени ДНК сонди, съответстващи на гените от коровия антиген (HbC-антиген) и Австралийския антиген (HbS-антиген) на вируса на хепатит В. Беше извършен хибридизационен анализ с радиоактивно и нерадиоактивно белязани сонди с цел скриниране на кръвен серум от пациенти с хепатит В и получените данни бяха съпоставени с данни от имунохимичен скрининг. В 60 % от серумите, в които е намерен чрез имунохимия Австралийски антиген беше открит ДНК фрагментът, кодиращ Австралийския антиген; а ДНК фрагментът, кодиращ коровия антиген беше намерен само в 15 % от серумите. Обсъдена е възможността за използване на тези сонди в клиничната практика в България.

5. M. Dineva, I. Devedjiev, E. Bratovanova, A. Ivanov, S. Chakarov, D. Petkov. (1994). Synthesis of oligonucleotides containing methylphosphonate bonds and their enzymatic extension using AMV reverse transcriptase. *Ann. Univ. Sofia* 83/86, 4, 11-16.

М. Динева, И. Деведжиев, Е. Братованова, А. Иванов, С. **Чакъров**, Д. Петков (1994). Синтез на олигонуклеотиди, съдържащи метил-фосфонатни връзки и тяхното

ензимно удължаване чрез използване на обратна транскриптаза AMV. Ann. Univ. Sofia 83/86, 4, 11-16.

Чрез прилагане на схемата на Engels, използвана в автоматичния твърдофазен синтез, беше синтезиран тимидин-метилфосфорамидит. Данните от тритиловата колориметрия и електрофоретичният анализ на неспецифичните хидролизни продукти показаха, че е извършен успешен синтез на олигонуклеотида TrmTrmTrmTrmTrmTrmTrmTrmTrmCpT. Пречистеният хетероолигонуклеотид беше изпробван като праймер за обратната транскриптаза AMV. Обратната транскриптаза използва успешно хетероолигонуклеотидния праймер както с глобинова поли-A⁺ - мРНК, така и с хетерогенна тотална РНК, получена от нервна тъкан на плъх като матрици, при температурен оптимум на ензима 42°C и 30°C. Дискутирани са възможностите за използване на този феномен в антисенс-технологията.

6. S. Chakarov, P. Vassilev, P. Stoilov, A. Angelova (1995). Protein changes in roots of winter wheat subjected to cold stress. *Biotechnol Biotechnol Equip* 9(4), 20-24.

С. Чакъров, П. Василев, П. Стоилов, А. Ангелова. (1995). Промени в белтъчния състав на коренчета от покълнеци от зимна пшеница, подложени на студов стрес. *Biotechnol Biotechnol Equip* 9(4), 20-24.

Бяха изследвани промените в белтъчния състав на коренчета от покълнеци от зимна пшеница на третия и на осмия ден след бързо понижаване на температурата от 25°C до 4°C. Белтъците бяха белязани през последните 12 часа преди събирането на покълнеци чрез L-[¹⁴C] аминокиселинна смес и бяха анализирани чрез сцинтилационно броене, едно- и двумерна гел-електрофореза и флуорография. Тоталното ниво на поемане на белега беше около десет пъти по-ниско в подложените на обработка растения и от двете серии. На третия ден след обработката се наблюдаваше изявена ивица с молекулна маса от 43 ± 3kDa и изоелектрична точка между рН 6.8 и 7.4. Получените резултати предполагат поява на преходна експресия на белтък (белтъци) с молекулна маса 43 kDa, което вероятно е израз на развитие на отговор на студовия стрес.

7. Chakarov S, Chakalova L, Tencheva Z, Angelova A (1995). HMG1/Y chromosome proteins in developing rat brain cells. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.*, 48 (11-12), 139-141.

Чакъров С, Чакалова Л, Тенчева Ц, Ангелова А (1995). Хромозомните HMG1/Y белтъци в клетки от развиващ се мозък на плъх. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.*, 48 (11-12), 139-141.

Хромозомните белтъци тип HMG1 се отнасят към отделно семейство HMG-белтъци, различно от семействата на HMG1/2 и HMG14/17 както по отношение на молекулната маса, така и по отношение на ДНК-свързващите свойства и специфичните аминокиселинни секвенции - мотиви, които се срещат в тях. До настоящия момент са идентифицирани три отделни члена на семейството на HMG1-белтъците, а именно HMG1 и HMGY белтъците, които се получават чрез алтернативен сплайсинг (поради което се наричат обобщено HMG1/Y белтъци) и HMGС, които бяха описани отначало и наблюдавани основно в трансформирани клетки. HMG1 - белтъците бяха открити и отначало изследвани основно в култивирани клетъчни линии, и се предполагаше, че играят роля при недиференцираното състояние на активно делящи се или туморни клетки. Въпреки това, техните биологични функции все още не са напълно изяснени. В настоящата работа ние представяме резултатите от сравнително проучване на ниво HMG1/Y белтъци и съответстващите им РНК транскрипти в мозъчни клетки на плъхове, намиращи се на различни стадии в индивидуалното развитие. Нашите

експериментални данни показват, че присъствието на НМGI белтъци в мозъчни клетки на плъх вероятно е свързано с недиференцираното и пролиферативно състояние на клетките, но доказването на директното участие на НМGI белтъците в поддържането на конкретно състояние на клетката изисква допълнителни данни.

8. Z. Tencheva, A. Velichkova, S. Chakarov (1995). Opioid effects on DNA-binding proteins in glial cells. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.*, 48 (6), 101-104.

Ц. Тенчева, А. Величкова, С. Чакъров (1995). Влияние на опиоиди върху ДНК-свързващите белтъци в глиални клетки. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.*, 48 (6), 101-104.

Експериментално е доказано предходно, че опиоидните пептиди играят роля в регулацията на растежа на невралните клетки. Също така, съществуват данни, че ендогенните опиоиди имат модифициращ ефект върху първични култури от неврални клетки и могат директно да подтискат растежа на астроцити в смесени култури от глиални клетки и в агрегати от фетални мозъчни клетки, а също така подтискат и пролиферацията на невробласти в условия *in vitro*. В няколко моделни системи беше показано, че опиоидите подтискат инкорпорацията на [³H]-тимидин в ДНК на развиващи се неврални клетки. Настоящото изследване демонстрира регулация на транскрипцията в глиални клетъчни култури под действие на опиоидни пептиди, опосредствана от секвенционно-специфични транскрипционни фактори. Бързата и преходна индукция на AP-1 под действието на опиоиди предполага евентуален механизъм на регулация на генната експресия в мозъчната тъкан, медирана от опиоид-рецепторно взаимодействие. Беше наблюдавана по-висока CTF/NF1 свързваща активност в третирани с опиоиди C₆ глиални клетки, култивирани за 48 часа в среда без добавка на FCS, което свидетелства за по-силна опиоидна индукция на този фактор в клетки, намиращи се в G₀ фаза на клетъчния цикъл. Получените от нас резултати навеждат на мисълта, че в транскрипционната регулация на генната експресия, зависима от опиоид-рецепторно взаимодействие, участват и други специфични механизми.

9. S. Chakarov, P. Vassilev, Z. Tencheva, A. Angelova (1997). Isolation and properties of human recombinant high mobility group I/Y chromosomal protein. *Biotechnol Biotechnol. Equip*, 11(3-4), 46-50.

С. Чакъров, П. Василев, Ц. Тенчева, А. Ангелова (1997). Изолиране и охарактеризиране на човешки рекомбинантен бързоподвижен хромозомен белтък група I/Y. *Biotechnol Biotechnol. Equip*, 11(3-4), 46-50.

В *E. coli* шам BL21(DE3) беше експресиран рекомбинантен човешки бързоподвижен хромозомен белтък група I/Y чрез използване на експресионната система на Студиър (1990). Клетките бяха трансформирани с бактериален плазмид pET15bHMG-I/Y, съдържащ кДНК от човешкия HMG-I/Y белтък, инсертиран в рамка за четене заедно с последователност, кодираща шест последователни хистидилови остатъка в N-края на белтъка (Thanos и Maniatis, 1992). Рекомбинантният белтък беше пречистен от тоталния белтъчен екстракт чрез селективно свързване на б-хистидиловата опашка върху Ni²⁺-NTA смола (Qiagen) в условията на металохелатна афинитетна хроматография. Полученият белтък беше анализиран чрез SDS-полиакриламидна гел-електрофореза и имунохимична детекция с антимоноклононо плъше НМGI-антитяло (IgG фракция). Имунопероксидазният тест беше извършен върху Western блотове с 4-хлоро-1-нафтол/водороден прекис като субстрат и върху дот блотове с луминол като субстрат, подобряващ излъчването при хемилуминисцентна реакция (ECL-Amersham Life Sci.). Електрофоретичните и имунохимичните характеристики на получения рекомбинантен човешки HMG-I/Y белтък бяха идентични

с тези на естествения HMG1 хромозомен белтък, получен от плъши мозък чрез екстракция с HClO₄.

10. Ангелова А, **Чакъров С**, Ганев В. Регулация на транскрипцията в еукариотни организми. Транскрипционни фактори. Сигнални пътища. Молекулярна медицина, 1997, 1.

11. Ангелова А, **Чакъров С**, Ганев В. Регулация на транскрипцията с на бързоподвижните нехистонови белтъци БПБ 1/2, БПБ I/Y и БПБ I-C. Възможна роля при туморигенеза и вирусни инфекции. Молекулярна медицина, 1997, 2(2), 1997.

12. **Чакъров С**, Русев Г. Увреждане и поправка на ДНК. Връзка между поправката на ДНК и транскрипцията. 1997, Молекулярна медицина, 1997, 2(2), 1997.

13. **Chakarov S**, Stoilov P, Alexandrov A, Russev G. (1997) Repair pattern in the β -globin gene cluster of human fibroblasts after ultraviolet irradiation. Eur J Biochem 248, 669-675.

√ Стоян Чакъров, Петър Стоилов, Александър Александров, Георги Русев. (1997) Особенности на поправката на ДНК в бета-глобиновия генен кластер на човешки фибробласти след облъчване с ултравиолетова светлина. Eur J Biochem 248, 669-675.

В настоящата работа ние разработихме принципно нова техника за оценка на поправката на увреждания в ДНК с различна структурна природа. Техниката беше използвана за изясняване на въпроса дали поправката на ДНК в отсъствие на транскрипция се извършва случайно (равномерно) или се структурират приоритети за някои региони на генома. Човешки фибробласти бяха облъчени с ултравиолетова светлина (3-10 J/m²) и бяха третирани със 7.5 mM хидроксиурея за подтискане на репликативния синтез на ДНК. През първите няколко часа след облъчването клетките бяха третирани с 5-бромдеоксиуридин за белязване на участъците, в които се извършва поправката, с презумпцията, че участъците, които се поправят по-ефективно, биха инкорпорирали по-голямо количество от белега. Първичната структура на 155 kb ДНК секвенция, съдържаща целия човешки β -глобинов локус беше сглобена при използване на последователностите, депозириани в базата данни на EMBL. Дванадесет РНК сонди с приблизително еднаква дължина, представителни за еднокопийни последователности по дължината на бета-глобиновия кластер бяха синтезирани *in vitro* и имобилизирани върху микротитърни плаки. Имобилизираните сонди бяха подложени на хибридизация с ДНК, получена от облъчените клетки. Количеството на 5-бромдеоксиуридина, инкорпорирани в резултат на поправката в ДНК фракциите, хибридизирани към различни РНК сонди беше определено чрез имунохистохимия, използвайки антитяло, специфично за този нуклеозид. Прилагайки описаната техника, ние наблюдавахме повишена ефективност на поправката в зоната, в която се намира SAR в 5'-края на бета-глобиновия домен през първите часове след облъчването с ултравиолетова светлина. Този резултат беше потвърден и с помощта на конвенционалната техника с използване на T4 ендонуклеаза V, чрез която се проследява отстраняването на циклобутан-пиримидинови димери.

14. Genova G, **Chakarov S**, Bojkova N (1997) Ribosomal DNA amplification in the salivary gland cells of *Drosophila melanogaster* under magnifying conditions. *Compt. Rend. Bulg. Acad. Sci.*, 50(11-12), 93-96.

Генова Г, **Чакъров С**, Бойкова Н (1997). Амплификация на рибозомната ДНК в слюнчени жлези на *Drosophila melanogaster* в условия на магнификация. *Compt. Rend. Bulg. Acad. Sci.*, 50(11-12), 93-96.

Гените от 18S и 28S рРНК при *Drosophila melanogaster* са обособени в два кластера, цитологично визуализирани като ядръцеви организатори в половите хромозоми. Мушици с частичен дефицит на който и да било от тези кластери имат специфичния мутантен фенотип *bobbed*. Въпреки че повтореността на рибозомните гени е относително стабилна, изменения в рибозомната ДНК, разположена върху X-хромозомата се случват с висока честота само в половите клетки на мъжки дрозофили с Y-хромозома, носеща мутацията *bobbed*. Мутантните *bobbed* алели в X-хромозомата претърпяват спонтанна реверсия към дивия тип и по този начин броят на рибозомните гени се възстановява. Смята се, че това се дължи на митотична и мейотична обмяна на сестрински хроматиди. В настоящата работа докладваме за драматично увеличение на броя на ядрата на клетките в слюнчените жлези с множествени ядръца при F1 мъжки дрозофили преди магнификация. Въз основа на предходни данни се предполагаше, че рДНК се натрупва стъпаловидно чрез постепенното ѝ намножаване в тестисите и соматичните тъкани на последователни поколения. Нашите резултати не подкрепят идеята за стъпаловидно натрупване на рДНК в соматичните тъкани. Подобно неколкостратно (до четирикратно) увеличение на броя на рибозомните гени във F1 премагнификационни мъжки дрозофили в сравнение с F7 е наблюдавано и от други автори. Нашите експерименти по *in situ* хибридизация показват, че се извършва неселективна амплификация на всички типове повторени рДНК в слюнните жлези през време на магнификацията.

15. Angelova A, **Chakarov S**, Tencheva Z. (1998). Effect of the HMG1/Y chromosomal proteins on the RNA polymerase activity in isolated brain nuclei. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 51(5/6), 91-92.

Ангелова А, **Чакъров С**, Тенчева Ц. (1998). Влияние на хромозомните белтъци HMG1/Y върху РНК полимеразната активност в изолирани ядра от мозъчна тъкан. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 51(5/6), 91-92.

HMG1/Y белтъците са нехистонови хромозомни фосфопротеини, които поради наличието на разлики с HMG1/2 и HMG14/17 белтъците са отделени в обособено семейство. Първоначално HMG1/Y белтъците бяха асоциирани с пролиферативното състояние на клетките и фенотипа на недиференцираните клетки. Наскоро беше показано, че HMG1/Y белтъците играят ключова роля за транскрипцията на някои гени, които вероятно функционират като коактиватори на етапа на инициация на транскрипцията. Необходими са, обаче, повече експериментални доказателства за изясняване на молекулярните механизми на процеса и за потвърждаване на теорията за неговата универсалност. В настоящата работа ние изследвахме ефекта на екзогенни HMG1/Y белтъци и анти-HMG1/Y-антитела върху тоталната РНК полимеразна активност и чувствителната на α -аманитин фракция в изолирани ядра от мозък на плъх чрез измерване на инкорпорацията на [^3H]-УТР в неразтворим в трихлороцетна киселина продукт. Може да се предположи, че HMG1/Y белтъците, които са най-вероятната мишена за анти-HMG1/Y-антителата са безусловно необходим компонент за РНК синтезата, катализирана от РНК полимеразата II. Очевидно, изолираните ядра от мозък на плъх съдържат достатъчно количество [HMG1/Y белтъци], което да поддържа

in vitro синтезата на РНК в използваната от нас експериментална система, но е необходимо те да присъстват в свободна (неблокирана) форма.

16. Chakarov S, Kirov S, Alexandrov A, Konstantinov B, Ganev V, Angelova A, Panajotov S (1998). Highly specific DNA probe for diagnostics of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Biotechnol Biotechnol Eq.*, 12 (1), 75-81.

Чакъров С, Киров С, Александров А, Константинов Б, Ганев В, Ангелова А, Панайотов С (1998). Високоспецифична ДНК сонда за диагностика на инфекции с *Mycoplasma pneumoniae*. *Biotechnol Biotechnol Eq.*, 12 (1), 75-81.

Беше анализирана наличната информация за генома на *Mycoplasma pneumoniae* и беше избран участък с максимално висока секвенционна специфичност, разположен в гена за P1 адхезина. Фрагмент от този ген с дължина 167 bp беше клониран и беше изследвана приложимостта му като хибридизационна сонда. Беше демонстрирана високата специфичност на подготвената сонда, което определя нейните качества като надежден диагностичен инструмент. На основа изследвания геномен регион беше създаден и изпитан диагностичен набор, използващ PCR технология.

17. Angelova A, Chakarov S, Marincheva B (1998). Immunochemical approach for analysis of stress response in wheat seedlings affected by different external factors. *Biotechnol Biotechnol Eq.* 12(2), 23-26.

Ангелова А, **Чакъров С**, Маринчева Б. (1998). Имунохимичен подход за анализ на стресовия отговор в пшенични покълнеци, подложени на въздействието на различни фактори от външната среда. *Biotechnol Biotechnol Eq.* 12(2), 23-26.

Беше разработен имунохимичен подход за сравнителен анализ на промените в белтъчния състав в пшенични покълнеци, подложени на различни стресови фактори. Подходът е базиран на производство на антитела срещу тотален белтъчен екстракт от кълнове на пшеница, подложени на студов стрес, като презумпцията е, че нивото на стресовите белтъци в ранните фази на отговора към студов стрес ще бъде високо поради сниженото общо ниво на физиологичните процеси. Поликлоналният антисерум беше пречистен афинитетно и обогатен чрез филтруване срещу тотален белтъчен екстракт от контролни кълнове. Анализът чрез Western блот техника изяви белтъчни профили, специфични за прилаганите стресови фактори. Както се вижда, разработеният от нас метод позволява едновременен анализ на различни стресови фактори. Той е бърз и високочувствителен, поради което може да бъде евентуално използван като предварителен тест за селекция на толерантни към стрес селскостопански растения и като алтернатива на използването на радиоактивно белязани вещества.

18. Penchovsky R, Chakarov S, Genova G. (1998). The tumour suppressor mutation 1(2)gd in *Drosophila melanogaster* elevates the binding activity of the transcription factors AP-1. *Compt. Rend. Bulg. Acad. Sci.*, 51(7-8), 83-86

Пенчовски Р, **Чакъров С**, Генова Г. (1998). Мутацията в тумор-супресорен ген 1(2)gd при *Drosophila melanogaster* повишава свързващата активност на транскрипционните фактори AP-1. *Compt. Rend. Bulg. Acad. Sci.*, 51(7-8), 83-86.

Активаторен протеин 1 (AP-1) е транскрипционен фактор, който се свързва към специфична палиндромна ДНК последователност (AP-1- място). Тази последователност регулира както базалната, така и индуцируемата транскрипция на множество клетъчни и вирусни гени. AP-1- семейството белтъци при *Drosophila* обхваща два белтъка, подобни по биохимични свойства на Fos и Jun и наречени, съответно, dFra и dJra (*Drosophila* Fos- и Jun - подобни антигени). За разлика от Fos – белтъците на бозайниците, dFra може да разпознава самостоятелно AP-свързващото място и може да

активира транскрипцията *in vitro* в отсъствието на dJra. Чрез използване на EMSA-анализ в настоящата работа ние изследвахме свързващата активност на AP-1-семейството белтъци в ларви на *Drosophila melanogaster*, склонни към образуване на тумори поради наличие на мутацията в тумор-супресорния генен locus *lethal [2] giant discs (l(2)gd)*. В настоящата работа наблюдавахме повишена свързваща активност, свързана с белтъка dJra и дискутираме евентуалното участие на AP-1 в склонния към туморообразуване фенотип.

19. Angelova A, **Chakarov S**, Avramova F, Simeonova V (1999). Protein changes in roots and epicotyles of winter wheat subjected to a short period of osmotic stress. *Ann. Univ. Sofia*, 90-91.

Ангелова А, **Чакъров С**, Аврамова Ф, Симеонова В (1999). Промени в белтъчния състав на коренчета и епикотили от зимна пшеница, подложени на краткотраен осмотичен стрес. *Ann. Univ. Sofia*, 90-91.

20. ✓ **Chakarov S**, Chakalova L, Tencheva Z, Ganev V, Angelova A. (2000). Morphine treatment affects the regulation of high mobility group I-type chromosomal phosphoproteins in C6 glioma cells. *Life Sci.* 2000 Mar 24; 66(18):1725-31.

✓ **Chakarov S**, Chakalova L, Tencheva Z, Ganev V, Angelova A. (2000). Третирането с морфин влияе върху регулацията на бързоподвижните хромозомни белтъци група I в C6 глиомни клетки. *Life Sci.* 2000 Mar 24; 66(18):1725-31.

Бързоподвижните хромозомни белтъци HMGI/Y и HMGI-C група I са фосфопротеини от типа на HMGI. В настоящата работа бяха изследвани свойствата на HMGI/Y и HMGI-C в C6BU-1 глиомни клетки след третиране с морфин. Клетките бяха белязани с [³²P] – ортофосфорна киселина. Електрофоретичните профили и автордиографиите показаха присъствие на HMGI и HMGI-C белтъци. HMGI-Y не беше намерен. Анализът чрез хибридизация по Northern идентифицира единичен HMGI/Y транскрипт. След третиране с морфин наблюдавахме понижение на инкорпорацията на [³²P] в HMGI и HMGI-C белтъците и понижение на нивото на HMGI/Y транскрипта, но не наблюдавахме промяна в съотношението на белтъците в гелове, обагрени по Кумаси. Въз основа на получените резултати предполагахме, че морфинът стимулира независими реакционни пътища, които влияят върху регулацията на транскрипцията и/или постсинтетичното фосфорилиране на предходно съществуващи белтъци от тип HMGI. В допълнение, бяха наблюдавани промени в постсинтетичното фосфорилиране на HMGI14 и хистони H1AB.

21. Petkova R, **Chakarov S**, Horvath A, Ganev V (2001). Coexistence of a Common Prothrombotic Risk Factor and Haemophilia in Bulgarian Haemophilic Population. *Balkan Journal of Medical Genetics* 4 (3 & 4), 37-39.

Петкова Р, **Чакъров С**, Хорват А, Ганев В. (2001). Сънаследяване на често срещан протромботичен рисков фактор и хемофилия в българската популация от индивиди с хемофилия. *Balkan Journal of Medical Genetics* 4 (3 & 4), 37-39.

Предполага се, че клиничното протичане на тежката хемофилия може да бъде повлияно от едновременното сънаследяване с молекулни дефекти, които при здрави индивиди причиняват повишаване на риска от венозен тромбоемболизъм в млада възраст. В настоящата работа ние изследвахме 31 български пациенти с тежка хемофилия А и Б (определено от циркулиращи нива под 1 % на фактори на кръвосъсирването VIII и IX, съответно). Клиничната картина при трима пациенти с тежка хемофилия А (10 % от изследваната извадка) беше необичайно лека спрямо очакваното от данните за нивото на дефицитния фактор. Мутацията FV Leiden

(G1691A) беше намерена в хетерозиготно състояние при само един от изследваните пациенти, при който обаче нямаше данни за смекчаване на клиничния фенотип. От резултатите от настоящото изследване може да се предположи, че в българската популация от пациенти с хемофилия парадоксалното по-леко клинично протичане на заболяването при някои от тях по всяка вероятност не е свързано с едновременно сънаследяване на протромботичния рисков фактор FVLeiden, или че относителният дял на случаите, при които протромботичният дефект оказва модулиращо влияние върху подлежащия дефект на кръвосъсирването е твърде малък.

22. R. Petkova, S Chakarov, I Kremensky (2004). Genetic Analysis of Haemophilia A in Bulgaria (2004) BMC Blood Disorders, 4:2, (18 Mar 2004).

Румена Петкова, **Стоян Чакъров**, Иво Кременски (2004). Генетичен анализ на Хемофилия А в България. BMC Blood Disorders, 4:2, (18 Mar 2004).

Хемофилия А и Б са най-често срещаните тежки наследствени разстройства на кръвосъсирването. В семействата, в които вече има един или повече членове с хемофилия, генетичният анализ осигурява възможност да се предотврати повторна поява на заболяването. Настоящото изследване създава основата на диагностична стратегия за определяне на риск от носителство и пренатална диагностика на хемофилия А в българската популация от индивиди с хемофилия. Изполваната диагностична стратегия се състои от скрининг за най-често срещаните мутации в гена за фактор VIII на кръвосъсирването и анализ на панел от осем скачени с локуса на фактор VIII ДНК полиморфизма. Анализът на полиморфизми в ДНК за определяне на статус на носителство по отношение на Хемофилия А беше успешен при 30 от 32 семейства (94 %). Статусът на носителство беше определен при 25 от 28 жени (89 %) с висок риск да бъдат носители на мутации, предизвикващи хемофилия А. Бяха проведени 14 пренатални диагностики при жени с висок риск да родят болно от хемофилия А дете, като в резултат бяха родени 6 здрави момчета и 5 момичета. Описаният в настоящата работа комбиниран подход може да бъде използван като високо информативна, ефективна и относително евтина стратегия за предотвратяване на повторна поява Хемофилия А в семейства, където вече има засегнати от заболяването членове. ДНК анализът улеснява определянето на статус на носителство и, при нужда, последваща пренатална диагностика в преобладаващата част от българските семейства, засегнати от Хемофилия А.

23. Petkova R, Chakarov S, Ganey V (2007). Genetic bases for predisposition to common multifactorial disease in man. Part I. Biotechnol Biotechnol Equip, 21(3), 286-293.

Петкова Р, **Чакъров С**, Ганев В (2007). Генетични основи на предразположението към често срещани болести с мултифакторна генеза. Част I. Biotechnol Biotechnol Equip, 21(3), 286-293.

Най-общо казано, всички човешки болести могат да бъдат отнесени към една от следните две категории – „наследствени” и „придобити”. Обикновено към първата категория се причисляват заболявания и състояния, които са пряко свързани с дефекти в конкретен ген или гени. Тези болести обикновено са редки или много редки, обикновено се проявяват в ранна възраст, и, поне доскоро, подходът към тях беше съсредоточен основно върху предотвратяване на повторна поява на заболяването в семейството. Втората категория обхваща огромен брой състояния, които се срещат често при човека, могат да се появят на всяка възраст, имат удължено хронично протичане и обикновено са свързани с висок потенциал за развитие на усложнения. Поради това, заболяванията от втората група често се означават с термина „социално-значими заболявания”. Преди по-малко от 20 години за първи път беше изказана

хипотезата, че социално значимите заболявания не представляват просто закономерен резултат от съвпадението на случайни инциденти в живота на човека и „нездравословен” начин на живот – например, отключване на захарен диабет вследствие на прекарана инфекция или стресов фактор при индивиди с т.нар. западен модел на хранене (богат на продукти, съдържащи рафинирана захар). След като концепцията за наличие на генетична предразположеност към развитие на определени често срещани заболявания беше утвърдена и призната за валидна, тези заболявания бяха наречени „мултифакторни”, за да се отбележи ясно значението на наличието на генетична компонента и на отключващи фактори на околната среда. Настоящият обзор в две части разглежда по-важните групи ДНК полиморфизми, които се използват като генетични маркери за определяне на предразположение към някои групи социално значими мултифакторни заболявания.

24. Petkova R, Chakarov S, Ganey V (2007). Genetic bases for predisposition to common multifactorial disease in man. Part II. Biotechnol Biotechnol Equip 21(4), 385-392.

Петкова Р, Чакъров С, Ганев В (2007). Генетични основи на предразположението към често срещани болести с мултифакторна генеза. Част II. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 21(4), 385-392.

Често срещаните болести при човека обикновено притежават генетична компонента. Рискът за един носител на алели, за които се знае, че са свързани с предразположение към някакво мултифакторно заболяване да развие конкретното заболяване е по-висок от риска за неносителите на тези алели и е пропорционален на относителната тежест на генетичната компонента в етиопатогенезата на болестта. Изясняването на статуса на носителство по отношение на алели, свързани с висок риск от развитие на дадено заболяване или група заболявания позволява на индивид-носител да вземе информирани решения по отношение на начина си на живот и избора на професията си и му дава възможност за ранно откриване и навременна интервенция при наличие на патологичен процес. Също така, специфични особености на генетичния „багаж” на индивида могат да играят важна роля при избора на най-подходящата форма на лечение при различните пациенти – т.нар. индивидуализирана терапия. Настоящата работа представлява втора част на обзор на съвременното състояние в областта на оценката на риска от предразположение към различни често срещани болести при човека. Описани са серия от маркери, свързани с оценката на генетично предразположение към различни заболявания и състояния, между които са маркери за вродена сърдечна патология, намалена костна плътност, предразположение към развитие на различни тумори, и за селективен подбор на групи пациенти, които биха имали най-голяма полза от определен вид лечение. Ролята на генетичните фактори е дискутирана и във връзка с някои непатологични особености, например способността за постигане на много високо мускулно натоваване при някои групи спортисти.

25. Petkova RD, Chakarov SA, Kremensky IM (2008). A Novel PCR - generated DNA Probe Used for Identification of the Most Common Defects Causing Severe Haemophilia A. Biotechnol Biotechnol Eq, 22(4), 1008-1010.

Петкова РД, Чакъров СА, Кременски ИМ (2008). Нова PCR - генерирана ДНК сонда, използвана за идентификация на най-често срещаните дефекти, причиняващи тежка хемофилия А. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 22(4), 1008-1010.

В гена за Фактор VIII са идентифицирани множество мутации от различен тип, между които точкови мутации, делеции, инсерции и различни реаранжировки. В около половината от пациентите с тежка форма на заболяването ($\approx 25\%$ от всички пациенти) се откриват големи инверсии на част от гена, които обикновено се детектират с

помощта на хибридизационен анализ по Southern. В настоящата работа представяме нова PCR-генерирана ДНК сонда за детекция на инверсии в гена за Фактор VIII в пациенти с тежка форма на Хемофилия А. Сондата показва висока степен на хомология към оригиналната сонда, описана в литературата, както и към съответната ДНК последователност в интрон 22 на гена за Фактор VIII. Не беше наблюдавана кръстосана хибридизация между сондата и ДНК, различна от човешката.

26. √ Chakarov SA, Petkova RD, Russev GCh (2008). Rapid and efficient method for production of T4 endonuclease V by heterologous expression in E.coli. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 22(4), 1011-1012.

√ **Чакъров СА, Петкова РД, Русев ГХ (2008).** Бърз и високоефективен метод за производство на Т4 ендонуклеаза V чрез хетероложна експресия в E.coli. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 22(4), 1011-1012.

Т4 ендонуклеаза V е фагов ензим, специфично разпознаващ циклобутан-пиримидиновите димери, които се получават в ДНК вследствие на облъчване с ултравиолетова светлина, като предизвиква на местата на разположение на димерите едноверижни скъсвания, които от своя страна служат като сигнал за активация на клетъчната машина за поправка на ДНК. Топикалното приложение на изолирана и пречистена Т4 ендонуклеаза V върху кожата на бозайници предизвиква повишаване на ефективността на поправка на предизвиканите от UV-облъчване увреждания. Т4 ендонуклеаза V може да се прилага както с цел повишаване на антислънчевата и анти-UV-защита при здрави индивиди, така и при пациенти с дефекти в поправката на ДНК като част от адювантната терапия. В настоящата работа ние представяме бърз и високоефективен метод за производство на Т4 ендонуклеаза V без използване на методи, включващи заразяване на бактериални култури със съответния фаг, което позволява по-лесно и по-евтино получаване на ензимен препарат със степен на чистота, задоволяваща изискванията на GMP при производство на лекарствени препарати, предназначени за използване при хора.

27. √ Chakarov S, Russev G. (2010). DNA repair and differentiation – does getting older means getting wiser as well? *Biotechnol Biotechnol Equip*, 24(2), 1804-1806.

√ **Чакъров С, Русев Г. (2010).** Поправка на ДНК и клетъчна диференциация. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 24(2), 1804-1806.

ДНК на клетката трябва непрекъснато да бъде поправяна, за да може да се поддържа целостта на генома и за да се осигури точно възпроизвеждане на генетичната информация при транскрипция. Известно е, че съществува значителна разлика между ефективността на поправяне на ДНК на транскрибираните гени и тази част от геномната ДНК, която не се транскрибира в момента. Напоследък започнаха да се натрупват експериментални данни, които свидетелстват, че състоянието на крайна диференциация на клетката влияе върху профила на поправката с изрязване на нуклеотиди, и по-точно, глобалната поправка на ДНК в нетранскрибираните участъци на генома бива подтисната, като активността на поправящата система се фокусира върху поправката, зависима от транскрипцията. Това би могло да бъде разглеждано не като дефект, неизбежно съпътстващ състоянието на терминална диференциация, а по-скоро като разумен компромис с интегритета на генома като цяло с цел да се осигури предпочитан поправка на участъците, в които се извършва активна транскрипция.

28. Arabadjiev B, Petkova R, **Chakarov S**, Momchilova A, Pankov R. (2010) Do we need more human embryonic stem cell lines? *Biotechnol Biotechnol Equip*, 24(3), 1921-1927.

Арабаджиев Б, Петкова Р, **Чакъров С**, Момчилова А, Панков Р. (2010). Наистина ли са ни необходими нови линии от човешки ембрионални стволови клетки? *Biotechnol Biotechnol Equip*, 24(3), 1921-1927.

Огромният потенциал на човешките ембрионални стволови клетки (чЕСК) е в основата на интензивното им изучаване, което е свързано със създаване на нови линии чЕСК. Към настоящия момент, според данните на изследователски групи от 24 страни, са създадени над 1000 линии от човешки ембрионални стволови клетки. Във връзка с противоречията във връзка с получаването на чЕСК от човешки ембриони е изключително важно да се изясни въпросът дали съществуващите линии чЕСК са достатъчни за обезпечат основните изследователски приложения и, в перспектива, евентуалните терапевтични приложения. В настоящия обзор ние разглеждаме накратко някои от най-важните аргументи в полза на продължаването на дейностите по получаване на нови линии от човешки ембрионални стволови клетки.

29. Arabadjiev B, Petkova R, Nonchev S, **Chakarov S**, Momchilova A, Pankov R (2010). Derivation of Human Embryonic Stem Cell Line from Discarded IVF Morula. *Compt. Rend. Bulg. Acad. Sci.*, 63(12), 1765-1770.

Арабаджиев Б, Петкова Р, Нончев С, **Чакъров С**, Момчилова А, Панков Р (2010). Получаване на линия човешки ембрионални стволови клетки от морула, останала „излишна“ след процедура по *in vitro* оплождане. *Compt. Rend. Bulg. Acad. Sci.*, 63(12), 1765-1770.

С настоящата работа докладваме за получаването и охарактеризирането на нова линия ембрионални човешки стволови клетки (чЕСК) – ВАМ1. Линията беше получена с използване на дарени човешки ембриони, останали неизползвани след процедура по *in vitro* оплождане, на етап на развитие морула и култивирани върху фидерен слой от STO клетки. Клетките експресираха белтъчни маркери, типични за недиференцираното състояние на чЕСК, включително повърхностните маркери SSEA-4 и TRA-1-60, транскрипционният фактор Oct-4 и високи нива на алкална фосфатаза. При оставяне на клетките да се диференцират спонтанно *in vitro*, те формираха структури, подобни на ембрионни телца и бяха способни генерират пигмент-съдържащо клетъчно поколение. Доколкото ни е известно, това е първият случай на успешно получаване на човешки ембрионални стволови клетки от дарен ембрион от български произход.

30. **Chakarov S**, Roeva I, Russev G. (2011). An Experimental Model for Assessment of Global DNA repair capacity. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 25(3), 2505-2507.

Чакъров С, Роева И, Русев Г. (2011). Експериментален модел за оценка на капацитета за глобална поправка на ДНК. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 25(3), 2505-2507.

Клетъчната ДНК е непрекъснато изложена на увреждащи агенти от екзогенен и ендогенен произход и, съответно, в нея непрекъснато се генерират увреждания. Механизмите за поправка на увреждания в ДНК са многобройни и разнообразни, но сред тях механизмът за поправка на увреждания чрез изрязване на нуклеотиди (nucleotide excision repair, NER) има най-широка специфичност за разпознаване и поправка на различни типове увреждания. Поправката на ДНК обикновено е свързана със синтез на ДНК, но относителният му дял спрямо общото ниво на синтез на ДНК в клетката (което се формира основно от репликативния ДНК синтез) е нисък, което затруднява точното му измерване. Настоящата работа представя експериментален модел, който позволява измерване и оценка специфично на нивото на репаративния ДНК синтез, основан на подтискане на репликативния синтез на ДНК с цел изявяване

на синтеза, свързан строго само с поправящата активност. Предлаганата от нас методология позволява оценка на нивото на поправката на увреждания в ДНК от всякакъв тип и във всякакви геномни региони, независимо от структурата им и транскрипционния им статус. Експерименталният модел би могъл да се използва като основа на развитието на диагностични методи за оценка на индивидуалния капацитет за глобална поправка на ДНК.

31. Petkova R, Chicheva Z, **Chakarov S.** (2011). Measuring telomere length – from ends to means. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 25(4), 2576-2582.

Петкова Р, Чичева З, **Чакъров С.** (2011). Методологии за оценка на дължината на теломери. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 25(4), 2576-2582.

Теломерите са рибонуклеотидни комплекси, с които завършват краищата на линейните еукариотни геноми. Те предпазват хромозомните краища от скъсяване и сливане помежду им. Скоростта на скъсяване на теломерите е свързана със стареенето на клетките и загуба на теломерна ДНК се наблюдава при значителен дял от заболяванията и състоянията при човека. Теломеразната активност може се използва за охарактеризиране на стволовоклетъчни линии като маркер за капацитета им за самоподновяване и потенциала им за диференциация до различни клетъчни типове. Настоящата работа разглежда съвременните методи за оценка на дължина на теломери в клетъчни популации и/или оценка на теломеразна активност – хибридизационен анализ по Southern, поточна цитометрия (flow FISH), real-time PCR и някои по-малко популярни методи от типа на TRAP анализ и STELA, изяснявайки предимствата и недостатъците на всеки от тези методи и очертавайки потенциалните приложни полета.

32. Chelenkova P, Petkova R, Yochev S, Vasilev M, **Chakarov S.** (2011) Brown trout-salmon hybrids in Bulgarian rivers are not a red herring. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 25(4), 2639-2641.

Челенкова П, Петкова Р, Йочев С, Василев, **Чакъров С.** (2011). Необичайни алели на микросателитен маркер в българските свободноживеещи популации на балканска (кафява) пъстърва (*S. trutta fario*). Следи от междувидова хибридизация в естествените популации. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 25(4), 2639-2641.

Кафявата, или балканска пъстърва (*Salmo trutta fario*) е популярен обект на любителския риболов в България и в Европа. Свободноживеещи („диви“) популации на балканска пъстърва живеят в редица студеноводни реки в България. Също така, изкуствените и естествените български водни басейни относително редовно се зарибяват с пъстървови видове. Проведеният генетичен анализ по микросателитен маркер, общ за няколко пъстървови вида, но позволяващ разграничаване по отношение на видовата принадлежност показва, че в някои български свободноживеещи популации на балканска пъстърва се наблюдават алели с дължина, нехарактерна за кафявата пъстърва, но типична за атлантическата съомга. Възможно е в българските водоеми, обитавани от балканска пъстърва да е налице субпопулация, при която се развива междувидова хибридизация с атлантическа съомга (*Salmo salar*). Тъй като, както е известно, хибридите между кафява пъстърва и атлантическата съомга са жизнеспособни и плодовити, съществува потенциален риск от интрогресия между двата вида. Една по-прецизно формулирана стратегия за зарибяване би подобрила перспективите за биоразнообразието на българските естествени популации от пъстървови риби.

33. Nikolova I, Galabov AS, Petkova R, **Chakarov S**, Atanasov B. Disoxaril mutants of Coxsackievirus B1: Phenotypic characteristics and analysis of the target VP1 gene. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C (Journal of Biosciences)*, Volume 66, Issue 11-12, 2011, Pages 627-636

Николова И., Гълъбов А. С., Петкова Р., **Чакъров С.**, Атанасов Б. Дизоксарилови мутантни форми на Коксакивирус В1: Фенотипни характеристики и анализ на прицелния VP1 ген. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C (Journal of Biosciences)*, Volume 66, Issue 11-12, 2011, Pages 627-636

Дизоксарилът инхибира ентеровирусната репликация посредством свързването си в хидрофобния „джоб“ на белтъка VP1 от обвивката на вируса, като по този начин стабилизира вириона и възпрепятства „разсъбличането“ на вирусната нуклеинова киселина. Резистентни към дизоксарил (RES) мутантни Коксакивируси В1 (CVB1/RES) бяха получени от див щам чувствителни към дизоксарил (SOF) вируси (CVB1/SOF) чрез селекционен подход. Зависими от дизоксарил (DEP) мутанти (CVB1/DEP) бяха получени след девет последователни пасажа на резистентните към дизоксарил мутанти в присъствие на дизоксарил. Бяха изследвани фенотипните характеристики на дизоксариловите мутанти. Изследването на репликацията на CVB1/DEP чрез вариране на времето на добавяне на компоненти показва, че в отсъствие на дизоксарил сглобяването на вирусната частица се преустановява. РНК последователностите на VP1 гена на дизоксариловите мутанти бяха сравнени със съществуващите в Gen Bank референтни последователности на CVB1. Аминокиселинната последователност на големия VP1 196-258 пептид (дизоксарил-свързващия участък) на CVB1/RES беше в значителна степен различна от тази на CVB1/SOF. Ключово важни промени в CVB1/RES бяха две точкови мутации, M213N и F237L, и двете в лиганд-свързващия джоб. Секвенционният анализ на CVB1/DEP показва известна реверсия към CVB1/SOF. Представени са аминокиселинните последователности на трите VP1 белтъка.

34. **Chakarov S**, Petkova R, Russev GCh. (2012). p53 – guardian angel and archangel. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 26(1), 2695-2702.

Чакъров С, Петкова Р, Русев ГХ. (2012). Роля на p53 в поправката на ДНК, жизнения цикъл на клетката и клетъчното делене. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 26(1), 2695-2702.

p53 е главният регулаторен белтък на клетъчния цикъл, който формира оценката на степента и мащаба на уврежданията в ДНК, интегрирайки разнообразните сигнали, постъпващи от увредената клетка. Той играе важна роля в генерирането на окончателното решение по отношение на потенциалните варианти на нейната понататъшна съдба – дали ще се предприемат дейности по поправка; или ще се инициира процесът на репликативно стареене на клетката; или ще се отключи програмираната клетъчна смърт; или ще се направи опит да се спаси животът на клетката чрез включване на механизмите на транслезия на транскрипция; или ще се извършат промени в метаболизма на клетката, които биха я насочили в една или друга посока на развитие. Правилното функциониране на p53 и свързаните с него сигнални пътища е есенциално важно при многоклетъчните еукариоти. Обикновено, понижаването на ДНК-свързващия капацитет на p53 е свързано с повишена склонност към развитие на тумори. Във всички популации съществуват и полиморфни варианти на p53, които не повишават значително склонността към туморообразуване, но влияят върху някои други особености, и по-точно, върху способността за предизвикване на спиране на клетъчния цикъл или за индуциране на апоптоза в увредени клетки. Съвременните изследвания показват, че p53 е не само основен участник в запазването на интегритета на генома и елиминирането на увредени клетки (заради което е получил популярното

название „ангел-пазител” на еукариотния геном), но и е и също така и неговият “ангел-душевадец”, тъй като, както се оказва, едновременно с това е и основният виновник за ограничаването на продължителността на живота на организма чрез стартиране на механизмите на клетъчното стареене. Нито една от двете функции не може да съществува без другата, и доколко носителството на една или друга полиморфна форма на p53 би била полезна или не дотам полезна за организма е строго индивидуално и зависи от редица външни и вътрешни фактори, между които е и възрастта на организма, тъй като особеностите на диференциалното действие на p53 стават по-изразени с напредване на възрастта.

35. Chelenkova P, Petkova R, Yochev St, Vasilev M, Malamov D, **Chakarov S.** (2012). One fish, two fish, old fish, new fish – is the biodiversity of Bulgarian native brown trout (*S. trutta fario*) populations at risk? *Biotechnol Biotechnol Equip* 26(2), 2894-2898.

Павлина Челенкова, Румена Петкова, Стоимен Йочев, Милен Василев, Добромир Маламов и **Стоян Чакъров** (2012). Съществува ли риск за биоразнообразието на българските естествени популации от балканска пъстърва (*S. trutta fario*)? *Biotechnol Biotechnol Equip* 26(2), 2894-2898.

Влиянието на дейностите на човека върху генетичната вариабилност на видовете е една от основните причини за загуба на биологичното разнообразие в световен мащаб. Настоящото изследване демонстрира, че генетичното разнообразие на българските естествени популации на балканска (кафява) пъстърва вече е модифицирано вследствие на изменения в генетичната структура на популациите, внесени чрез активно, медирано от човека ограничено кръстосване и/или междувидова хибридизация с други пъстървови видове. Рискът от възникване на нежелани генетични последици за естествените популации вече е значителен. Въвеждането на по-строга политика по отношение на зарибяванията на естествените водоеми и засилването на контрола върху географския произход на внасяните (целенасочено или случайно) риби в „дивите” популации би допринесло за опазването на биоразнообразието в България.

36. Petkova D, Staneva G, Markovska T, Iliev I, Ivanova I, Pankov R, **Chakarov S,** Momchilova A (2012). Fructooligosaccharide intake alters the phospholipid and fatty acid composition of liver plasma membranes. *Biotechnol Biotechnol Equip* 26(2), 2904-2909.

Петкова Д, Станева Г, Марковска Т, Илиев И, Иванова И, Панков Р, **Чакъров С,** Момчилова А (2012). Приемът на фруктоолигозахариди предизвиква промяна в състава на плазмените мембрани на чернодробни клетки по отношение на фосфолипидното им съдържание и съдържанието на мастни киселини в тях. *Biotechnol Biotechnol Equip* 26(2), 2904-2909.

Приемът на пребиотици обикновено е свързан с промени в стомашно-чревната микрофлора и липидите в кръвния серум. Обикновено се обръща по-малко внимание на ефектите на пребиотиците върху липидите в мембраната на чернодробните клетки. Нашата хипотеза е, че наблюдаваните промени в серумните липиди вероятно са свързани с промени във фосфолипидите в мембраната на чернодробните клетки при животни, хранени с диета, богата на фруктоолигозахариди (ФОЗ). Тази хипотеза беше подложена на изпитание чрез проучване на състава и структурната организация на липиди от плазмени мембрани на чернодробни клетки, изолирани от плъхове, подложени на диета, богата на ФОЗ. Резултатите показаха, че количеството на сфингомиелина (СМ) се увеличава значително в мембрани от плъхове, хранени с ФОЗ. Сфингомиелиназната активност беше по-ниска в мембраните от плъхове от групата, хранена с ФОЗ, което може да е в основата на наблюдаваното повишаване на количеството на СМ. Също така, процентът на окисляемия холестерол беше по-нисък в

плазмените мембрани на плъхове, хранени с ФОЗ. Успоредно, съотношението наситени/ненаситени мастни киселини и параметърът структурен порядък (structural order parameter, SDPH) бяха понижени в мембраните на плъхове, хранени с пребиотици. В заключение - нашите резултати показват, че приемът на пребиотици, каквито са например фруктоолигозахаридите, може да повлияе върху съдържанието на специфични липиди и флуидитета на плазмените мембрани на чернодробни клетки от експериментални животни. Тези резултати предполагат евентуална връзка на полезния ефект на приемането на пребиотиците с липидното съдържание.

37. Lupanova T, Petkova D, Markovska T, Staneva G, **Chakarov S**, Skrobanska R, Pankov R, Momchilova A (2012). Effect of Cholesterol Modulation on the Antioxidant Potential of Quercetin in Rat Liver Plasma Membranes. *Compt. Rend. Bulg. Acad. Sci.*, 65(5), 639-644.

Лупанова Т, Петкова Д, Марковска Т, Станева Г, **Чакъров С**, Скробанска Р, Панков Р, Момчилова А (2012). Влияние на модулирането на холестерола върху антиоксидантния потенциал на кверцетин в плазмени мембрани от черен дроб на плъх. *Compt. Rend. Bulg. Acad. Sci.*, 65(5), 639-644.

Бяха извършени изследвания на влиянието на понижението на холестерола върху антиоксидантния потенциал на флавоноида кверцетин в плазмени мембрани от чернодробни клетки на плъх. Резултатите показаха, че натрупването на реактивни форми на кислорода в интактни мембрани е значително по-ниско в сравнение с мембрани с намалено количество на холестерол в присъствие на кверцетин. Това ясно показва, че нивото на мембранния холестерол е важен фактор, който влияе върху капацитета на флавоноидни антиоксиданти от типа на кверцетин да предпазват мембранните липиди от окислително увреждане. Напълно е възможно този ефект да е свързан с промени в структурната организация на мембраната, предизвикани от понижаване на нивото на холестерола, в резултат на което бислоят се втечнява. Тъй като тези промени често са свързани с дестабилизация на мембраната и вероятно със загуба на аминокислотната асиметрия, ние измерихме също така и промените в разпределението на фосфатидилетаноламина (ФЕ) във външния монослой на клетъчната мембрана. Резултатите показаха, че екстернализацията на ФЕ е значително по-висока в присъствие на кверцетин в мембрани със намалено съдържание на холестерол в сравнение с интактни мембрани. Въз основа на това, ние предполагахме, че по-интензивното натрупване на реактивни форми на кислорода в мембрани с понижено съдържание на холестерол е тясно свързано с промени в структурната организация на мембраната, и с евентуална дестабилизация на липидния бислой. Вероятно флавоноидните молекули взаимодействат преобладаващо с богатите на холестерол домени от типа на *raft*-микродомени, и намалението на относителното съдържание на последните намалява ефективността на антиоксидантната защита.

38. Chicheva Z, Chelenkova P, Petkova R, **Chakarov S** (2012). Children of the Sun, children of the Moon – a mini-panel for assessment of inter-individual variation between the capacity of healthy individuals to repair everyday genotoxic insults. *Biotechnol Equip Biotechnol Equip*, 26(4), 3142-3147.

Чичева З, Челенкова П, Петкова Р, **Чакъров С** (2012). Мини-панел за оценка на индивидуалните вариации между капацитета на здрави индивиди за поправка на ежедневно възникващите генотоксични увреждания. *Biotechnol Equip*, 26(4), 3142-3147.

Машината за поправка на ДНК в нормалните човешки клетки обикновено се справя успешно с последствията от ежедневно възникващите ДНК увреждания в

продължение на години и десетилетия, преди да се проявят каквито и да било нежелателни ефекти от генотоксичното въздействие. Даже и между клинично здравите индивиди, обаче, съществува значителна степен на вариация по отношение на тяхната способност да разпознават и поправят генотоксични увреждания. Някои аспекти от тази вариантност възникват още със зачатие и оказват влиянието си през целия живот на индивида (генетично-обусловени фактори, каквито са например полиморфизмите в гени, кодиращи продукти, които участват в поправката на ДНК); докато други (напр. дължина на теломери) могат да се формират като резултат от взаимодействието между фенотипа и генотипа и да бъдат модифицирани от фактори на средата. До настоящия момент са описани множество маркери за оценка на капацитета за справяне с генотоксични увреждания, но, както се оказва, само някои от тях имат реална собствена стойност при оценка на репаративния капацитет във физиологични и/или патологични условия. В настоящата работа ние представяме резултатите от изследване за приложимост на мини-панел (p53 P72R, XPCins83PAT, темп на скъсяване на дължина на теломери) за оценка на капацитета на клинично здрави индивиди за поправка на генотоксични увреждания и очертаваме потенциалните приложни полета.

39. Khalil HS, Tummala H, **Chakarov S**, Zhelev N, Lane DP (2012). Targeting ATM pathway for therapeutic intervention in cancer. *Biodiscovery* 2012; 1: 3; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2012.1.3

Халил ХС, Тумала Х, **Чакъров С**, Желев Н, Лейн ДП (2012). ATM-опосредстваната регулация като мишена за терапевтични интервенции при ракови заболявания. *Biodiscovery* 2012; 1: 3; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2012.1.3

Генът Ataxia Telangiectasia Mutated (*ATM*) кодира белтъка ATM, който играе ключова роля в сигналните пътища, индуцирани от увреждания в ДНК (DNA damage response, DDR) и отговорни за поддържането на интегритета на генома на клетката. Белтъкът ATM принадлежи към фамилията протеинкинази с висока молекулна маса, съдържащи фосфатидилинозитол-3 каталитичен домен, между които са ATM, ATR и PI3K. ATM осигурява ключово важно свързващо звено между уврежданията в ДНК, прогресията в клетъчния цикъл и смъртта на клетката, като разпознава директно двуверижни скъсвания в ДНК и активира чрез фосфорилиране други downstream-разположени белтъци, които участват в поправката на ДНК, спирането на клетъчния цикъл и апоптозата. Клетките на бозайниците непрекъснато са подложени на генотоксични атаки от разнообразен произход и, съответно, се нуждаят от ефективен механизъм за разпознаване и поправка, за да поддържат интегритета на ДНК или да активират алтернативни пътища, които завършват по различен начин за клетката. Настоящият обзор разглежда ролята на ATM в сигнализационните пътища, свързани с увреждане на ДНК и описва взаимодействията на ATM киназата с други белтъци в хода на изпълнението на функциите ѝ. Специален акцент е ролята на натрупването на познанията за сигнализационните пътища, свързани с увреждане на ДНК в идентификацията на прицелни точки за антиракова терапия, като очертава ролята на ATM като мишена за терапевтични интервенции при ракови заболявания. Дискутира се и приложението на мрежовия подход за идентификация и охарактеризиране на инхибитори на ATM и за предварителна оценка на техния антитуморен потенциал.

40. Arabadjiev B, Petkova R, Momchilova A, **Chakarov S**, Pankov R (2012). Of mice and men – differential mechanisms of maintaining the undifferentiated state in mESC and hESC. *Biodiscovery* 2012; 3: 1; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2012.3.1

Арабаджиев Б, Петкова Р, Момчилова А, **Чакъров С**, Панков Р (2012). Диференциални механизми за поддържане на недиференцираното състояние при миши и човешки ембрионални стволови клетки. *Biodiscovery* 2012; 3: 1;

DOI: 10.7750/BioDiscovery.2012.3.1

Поддържането на основните дефиниращи характеристики на недиференцираните клетки *in vitro* и *in vivo* се извършва чрез сложни взаимодействия на различни механизми, в които се включват както молекулни събития, вътрешни за клетката, така и извънклетъчни сигнали. Екзогенните и ендогенните механизми, участващи в поддръжката на „стволовостта“ на клетката се сложно преплетени и могат да бъдат модулирани от външни стимули. Лабораторните мишки (и, заедно с тях, и лабораторните плъхове) са широко използвани животински модели, за които почти универсално се счита, че са от една страна достатъчно биологично близки до човека, за да могат да бъдат използвани в изследователската дейност и свързаните приложни направления, които като крайна цел са предназначени за използване в биологията на човека и хуманната медицина, като, от друга страна, са достатъчно еволюционно отдалечени от приматите, за да не е свързана изследователската дейност върху тях с толкова много етични ограничения. Изследването на специфичните молекулярни особености на двата вида в контекста на поддържането на недиференцираното състояние на миши ембрионални стволови клетки (мЕСК) и човешки ембрионални стволови клетки (чЕСК) осигурява на изследователите уникалната възможност да проследят и изяснят мрежата от взаимодействия, която участва в определянето на съдбата на клетката в различни условия; да направят интересни заключения за успоредната еволюция на двата вида и да оценят как различни варианти на базовите процеси в клетката са били изпитвани в хода на процеса на еволюция. Настоящият обзор разглежда накратко основните сигнализационни пътища, отговорни за поддържане на недиференцираното състояние на мЕСК и чЕСК и анализира някои основни аспекти на молекулярната физиология, които са уникално присъщи за съответния вид.

След присъждане на академичното звание „доцент“:

41. Petkova R, Chelenkova P, Yemendjiev H, Tsekov I, **Chakarov S**, Kalvachev Zl. HPV has left the building – the absence of detectable HPV DNA and the presence of R allele/s for the P72P polymorphism in the TP53 gene may call for more aggressive therapeutic approach in HPV-associated tumours. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2013 27(6):4217-4221.

Петкова Р, Челенкова П, Йеменджиев Х, Цеков И, **Чакъров С**, Кълвачев Зл. Отсъствието на ДНК на HPV и присъствието на R алел/и на полиморфизма P72P в гена TP53 може да е индикация за по-агресивен терапевтичен подход при тумори, асоциирани с HPV. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2013 27(6):4217-4221.

Инфекцията с HPV е основен патогенетичен фактор при карцинома на шийката на матката, при сквамозните карциноми на главата и шията и при други тумори с епителен произход. Трайното наличие на ДНК на HPV, установено с рутинни методи е рисков фактор развитие на високостепенна CIN. При пациенти, лекувани с хирургични и нехирургични модалности (радиотерапия, химиотерапия), трайното присъствие на HPV се счита за свързано с повишен риск от нова локална поява на тумора. Нееднократно е бело демонстрирано, че пациентите с рак на шийката на матката и други HPV-асоциирани тумори, при които ДНК на вируса присъства трайно в туморната тъкан имат по-добра прогноза от пациентите с HPV-негативни тумори.

Полиморфизмът Р72R в човешкия ген TP53 е независим фактор, модифициращ фенотипа при пациенти с тумори. R алелът е свързан с по-висока склонност към апоптоза на носещите го клетки, отколкото Р алелът. Въпреки това, обаче, има данни, че хомозиготите с RR генотип се срещат много по-често в изследваните групи пациенти с HPV-асоциирани тумори, както и че Р алелът при пациенти с R/R хетерозиготен генотип преференциално се делетира, докато R алелът преференциално се подлага на мутагенеза. Възможно е HPV-зависимата карциногенеза да е зависима от присъствието на HPV и от нивата на експресията на онкобелтъците E6 и E7 само в ранните фази на трансформация на инфектираните клетки (CIN). Това може да е свързано с активиране на латентен HPV, което от своя страна създава условия на релаксиран контрол върху интегритета на генома на инфектираната клетка. Процесът се развива по-нататък по механизми, независими от присъствието на HPV в клетката и, ако вирусът бъде елиминиран от имунната система в по-късен момент, това не би било достатъчно да се преустанови вече започналата неопластична трансформация. Отсъствието на ДНК на HPV DNA в проби от тумори на шийката на матката, преди или след лечение, не би трябвало да съставлява основание за намаление на честотата на мониторинга и да е причина за непредприемане на по-нататъшно лечение, тъй като е възможно генът TP53 в инфектираните клетки да е бил подложен на модификация по механизми на независима от HPV мутагенеза. Туморите на шийката на матката, които са негативни по отношение на наличие на ДНК на HPV трябва да бъдат обект на повишено внимание от страна на лекуващите лекари поради риска от повишен малигнен потенциал, така че да бъдат вземани предвид и възможностите за по-агресивна антиракова терапия, особено при носители на R алела на полиморфизма P53R.

42. Petkova R, Arabadjiev B, **Chakarov S**, Pankov R. Are you a man, or a mouse? Current state of the opportunities for derivation of germ-like cells from pluripotent stem cells. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2014, 28(2), 184-191.

Петкова Р, Арабаджиев Б, **Чакъров С**, Панков Р. Съвременно състояние на възможностите за получаване на полови клетки и техни предшественици от плурипотентни стволови клетки. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2014, 28(2), 184-191.

Допреди разработването на методологията за получаване на индуцирани плурипотентни клетки, качеството плурипотентност беше считано за ограничена от времето привилегия - само за клетките на ранните ембриони при бозайниците. По-късно стана ясно, че дефиницията на плурипотентността като способност за образуване на всички клетки на възрастния организъм също е доста спорна, тъй като някои типове диференцирани клетки, каквито са например половите клетки, се произвеждат много трудно от плурипотентни клетки. Наскоро беше изказано схващането, че плурипотентните клетки съществуват в повече от едно (поне две) различни състояния, които се различават коренно по времето, през което съществуват, основните сигнализационни механизми, свойствата на клетките, капацитетът им за диференциране до различни клетъчни типове, и т. н. Тези две състояния бяха наречени, съответно, „наивно” състояние и „подготвено” състояние (от „подготвено за диференциация”, което обаче е есенциално различно от „обвързването” (commitment) към диференциация). Полови клетки и техни предшественици (прогениторни полови клетки, ППК) досега са били успешно получавани *in vitro* от ембрионални стволови клетки и индуцирани плурипотентни клетки на гризачи. Опитите за получаване на ППК и полови клетки от плурипотентни клетки на примати, обаче, засега имат ниска успеваемост, особено когато става дума за женски полови клетки и техни предшественици. Настоящият обзор разглежда особеностите на ембрионалните стволови клетки от гризачи и от примати по отношение на капацитета им за

диференциация *in vitro* до прогениторни полови клетки, като изявява основните проблеми в тази връзка при плурипотентни клетки от примати по принцип и, в частност, човешки плурипотентни стволови клетки.

43. Pavlina Chelenkova, Rumena Petkova, Teodora Chamova, Sashka Zheliazkova-Glaveeva, Ivaylo Tournev, **Stoyan Chakarov**. Homozygous carriership of the wildtype allele of the XPCins83 polymorphism is an independent protective factor against cerebrovascular incidents in the Bulgarian population. *Compt Rend Acad Bulg Sci* 2014; 67(2):263-268.

Павлина Челенкова, Румена Петкова, Теодора Чамова, Сашка Желязкова-Главеева, Ивайло Търнев, **Стоян Чакъров**. Хомозиготното носителство на „дивия тип“ алел на XPCins83 е независим протективен фактор за мозъчно-съдовите инциденти в българската популация. *Compt Rend Acad Bulg Sci* 2014; 67(2):263-268.

Носителството на вариантни алели на гени, кодиращи белтъци, които участват в поправката на ДНК може да играе роля във формирането на риска за много често срещани мултифакторни заболявания и състояния с късно начало. Анализирахме генотипове на здрави индивиди и индивиди с мозъчно-съдова болест за често срещаните генетични полиморфизми TP53 P72R, XPCins83 и ERCC1 C8092A с цел да изясним наличието на вариантност, която би могла да играе роля за формирането на риска от мозъчно-съдова болест в българската популация. Възможно е „репаративно-компетентният“ *del* алел на полиморфизма XPCins83 да представлява селективно предимство за носителите си по отношение на риска от мозъчно-съдови инциденти, независимо от статуса на носителя по отношение на полиморфизма P72R.

44. Rossitsa Hristova, Yulia Petseva, Iskra Yanakieva, Mihaela Peycheva, Rumena Petkova, Anastas Gospodinov, **Stoyan Chakarov**, Lyubomira Chakalova. The human foetal globin genes exhibit a two-wave pattern of transcription in primary erythroid cultures. *Compt Rend Acad Bulg Sci* 2014; 67(2):257-262.

Росица Христова, Юлия Пецева, Искра Янакиева, Михаела Пейчева, Румена Петкова, Анастас Господинов, **Стоян Чакъров**, Любомира Чакалова. Транскрипцията на човешките фетални глобинови гени в първични еритроидни култури показва двуфазен профил. *Compt Rend Acad Bulg Sci* 2014; 67(2):257-262.

Феталният хемоглобин е основният тип хемоглобин, произвеждан във фетуса при човека. Той се заменя почни напълно с хемоглобина, характерен за възрастните индивиди скоро след раждането на детето. Тази замяна се извършва вследствие на превключване на експресията на глобиновите гени от високо ниво на експресия на феталните глобинови гени HBG1 и HBG2 към преобладаваща експресия на гена за „възрастния“ бета-глобин HBB в клетките от еритроидната линия. Вече няколко изследователски групи, обаче, докладват, че намират, че експресията на феталните глобинови гени не е напълно потисната в еритроидни клетки от възрастни индивиди, а се експресира за кратко време по време на еритроидната диференциация при възрастния индивид. В настоящата работа използвахме флуоресцентна *in situ* хибридизация на първични транскрипти на РНК за изучаване на транскрипцията на феталните глобинови гени в култивирани първични еритроидни клетки. Демонстрирахме, че промените в транскрипцията на феталните глобинови гени в хода на култивирането показват двуфазен профил. Нашите резултати показват, че това е резултат от паралелна диференциация на две различни прогениторни линии, които по различно време достигат стадия на диференциация, в който се експресират феталните глобинови гени. Това подкрепя теорията за съществуване на кратък времеви „прозорец“ по време на еритроидната диференциация при възрастните индивиди, през който HBG гените са активни.

45. Rumena Petkova, Pavlina Chelenkova, Elena Georgieva, **Stoian Chakarov.** What's your poison? Impact of individual repair capacity on the outcomes of genotoxic therapies in cancer. Part I – role of individual repair capacity in the constitution of risk for late-onset multifactorial disease. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2013; 27(6): 4208-4216.

Румена Петкова, Павлина Челенкова, Елена Георгиева, **Стоян Чакъров.** Влияние на индивидуалния репаративен капацитет върху прогнозата след генотоксични антиракови терапии. Част I – роля на индивидуални репаративен капацитет за формирането на риска от мултифакторни заболявания с късно начало. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2013; 27(6): 4208-4216.

Капацитетът за поправка на увреждания в ДНК може да варира значително при клинично здравите индивиди и при пациенти с различни заболявания и състояния. Той е допълнителен рисков фактор за развитие на заболявания с мултифакторна генеза и късно начало и може да играе значителна роля при определянето на приложимост на терапии при конкретни пациенти и за оценка на риска от различни усложнения, свързани с терапията. Понастоящем най-добре са проучени ефектите на индивидуалната вариантност в капацитета за поправка на ДНК при раковите заболявания при човека. Първата част на настоящата работа разглежда накратко историята на развитието на областта на индивидуалния репаративен капацитет и наличните към момента биомаркери за индивидуален капацитет за поправка на ДНК, за които е намерена връзка с риска от развитие на тумори и други мултифакторни заболявания с късно начало.

46. Rumena Petkova, Pavlina Chelenkova, Elena Georgieva, **Stoian Chakarov.** What's your poison? Impact of individual repair capacity on the outcomes of genotoxic therapies in cancer. Part II – information content and validity of biomarkers for individual repair capacity in the assessment of outcomes of anticancer therapy. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2014, 28(1), 2-7.

Румена Петкова, Павлина Челенкова, Елена Георгиева, **Стоян Чакъров.** Влияние на индивидуалния репаративен капацитет върху прогнозата след генотоксични антиракови терапии. Част II – информационно съдържание и приложимост на биомаркери за индивидуален репаративен капацитет при съставяне на прогноза за изхода след генотоксични антиракови терапии. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2014, 28(1), 2-7.

Индивидуалната вариантност в ефективността на поправка на увреждания, предизвикани от генотоксични терапии може да бъде важен фактор за оценка на приложимост на различни антиракови терапии при конкретни пациенти, за оценка на потенциалните изходи от различни терапии и евентуалите свързани с терапията усложнения, включително остра и късна токсичност и развитие на резистентност. Втората част на настоящата работа е посветена на анализа на наличната информация за възможностите за приложение на експерименталните данни за индивидуалния репаративен капацитет за целите на персонализираната медицина и здравните грижи.

47. Chakarov S, Petkova R, Russev GCh, Zhelev N. DNA damage and mutation. Types of DNA damage. BioDiscovery 2014; 11: 1; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2014.11.1.

Чакъров С, Петкова Р, Русев ГХ, Желев Н. ДНК увреждане и мутации. Типове увреждания в ДНК. BioDiscovery 2014; 11: 1; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2014.11.1.

Настоящият обзор описва основните типове поправка на увреждания в ДНК, предизвикани от екзогенни и ендогенни фактори, анализира възможните последици от всеки тип увреждания и дискутира нуждата от наличие на специализирани механизми за поправка на различни увреждания. Разгледани са механизмите, чрез които незначително увреждащо събитие може да доведе до възникване на унаследими мутации в ДНК. Разгледани са основните особености на ролята на уврежданията в ДНК в процеса на стареене и карциногенеза. Подробно е дискутирана ролята на ятрогенните ДНК увреждания при човека (въведени специфично като част от терапията или като нежелан отложен ефект на генотоксични терапии).

48. Chakarov S, Petkova R, Russev GCh. Individual capacity for detoxification of genotoxic compounds and repair of DNA damage. Commonly used methods for assessment of capacity for DNA repair. BioDiscovery 2014; 11: 2; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2014.11.2.

Чакъров С, Петкова Р, Русев ГХ. Индивидуален капацитет за детоксикация на генотоксични вещества и поправка на увреждания в ДНК. Често използвани методологии за оценка на капацитета за ДНК поправка. BioDiscovery 2014; 11: 2; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2014.11.2.

В първата част на настоящия обзор се разглеждат основните постижения в бързо развиващата се област на изследване на индивидуалния капацитет за поправка на генотоксични увреждания. Компонентите на индивидуалния репаративен капацитет са разгледани в детайл. Оценени са влиянието на унаследяемата компонента на механизмите за детоксикация на генотоксични вещества (определяне на риска от възникване на увреждане в ДНК) и на капацитета за поправка на вече възникнало увреждане. Дискутирана е ролята на капацитета за поправка на увреждания в ДНК за формирането на риска от различни заболявания (рак и други често срещани заболявания и състояния като диабет, атеросклероза и сърдечно-съдови заболявания) и като фактор за оценка на изхода от генотоксични терапии (приложимост на терапии със специфични агенти, риск от сериозни нежелани ефекти, преживяемост и др). Обзорът съдържа подробен списък на използваните към момента биомаркери (основно полиморфизми в ДНК, а също така и ензими и други фенотипни маркери, като напр. маркери за капацитета за самоподновяване на клетъчни популации), които могат да бъдат потенциално приложими при оценка на риска от възникване на тумори или развитие на други заболявания. Втората част на обзора представлява кратък преглед на базовата методология за получаване на експериментални данни при оценката на ефективността на поправка на ДНК в живи клетки за целите на изследователската дейност и диагностиката.

49. Chakarov S, Petkova R, Russev GCh, Zhelev N. DNA repair and carcinogenesis. BioDiscovery 2014; 12: 1; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2014.12.1.

Чакъров С, Петкова Р, Русев ГХ, Желев Н. Поправка на ДНК и туморигенеза. BioDiscovery 2014; 12: 1; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2014.12.1.

Настоящият обзор е посветен на природния феномен туморигенеза, като се разглеждат в подробности потенциалните причини, рискови фактори, механизми и евентуалните изходи от заболяването. Разглеждат се молекулните механизми, които водят до неконтролиран клетъчен растеж и увеличен капацитет за колонизация на

отдалечени топологични локации с оглед на тяхната роля като потенциални фактори поотделно и като част от общ патофизиологичен механизъм. Представени са базовите класификации на клетъчни гени, кодиращи продукти, които участват директно или индиректно в процеса на карциногенеза (протоонкогени, тумор-супресорни гени, мутаторни гени и гени, свързани с базовата поддръжка и защитат на интегритета на генома) с оглед по-пълно представяне на функциите на кодираните от тях белтъци в процеса на карциногенеза. Разгледани са често използваните от раковите клетки механизми за избягване от контрола на системите за проверка на ДНК за увреждания, поправка на ДНК и програмирана клетъчна смърт и за деактивация и/или елиминация на антиракови лекарства. Извършен е преглед на настоящите и евентуалните бъдещи възможности за преустановяване и забавяне на туморния растеж (за конкретни типове тумори и за явлението 'рак' като цяло) и е формулирана теория, постулираща, че туморигенезата е природен механизъм, възникнал с цел намаляване на риска от еволюционна стагнация.

50. Chakarov S, Petkova R, Russev GCh, Zhelev N. DNA damage and the circadian clock. *BioDiscovery* 2014; 13: 1; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2014.13.1.

Чакъров С, Петкова Р, Русев ГХ, Желев Н. Връзка между ДНК поправката и циркадианния ритъм на клетката. *BioDiscovery* 2014; 13: 1; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2014.13.1.

Известна е ролята на циркадианния ритъм (биологичния часовник) за практически всички физиологични процеси. Едва наскоро, обаче, беше показано, че в определени часове на денонощието клетките са по-чувствителни към агенти, предизвикващи увреждания в ДНК; че максималните нива на синтез на мРНК и белтъци, участващи директно или индиректно в поправката на ДНК се постигат по различно време в различните тъкани, и че растежът на туморната маса при някои типове тумори се подчинява на циркадианен ритъм. Настоящият обзор разглежда специфичните особености на „биологичния часовник“ в живите клетки, във връзка с поправката на увреждания и по отношение на неговата роля в процеса на стареене и карциногенеза. Дискутирана е ролята на унаследимите полиморфизми и соматичните мутации за риска от развитие на често срещани заболявания (тумори, затлъстяване, метаболитен синдром), техният ход и изход в животински модели и при човека. Циркадианните осцилации в нивата на ключовите белтъци на ДНК поправката и свързаната с нея сигнализация са разгледани във връзка с механизмите на защита от генотоксични увреждания. Обзорът засяга съвременната концепция за антиракова 'хронотерапия' и за подобряване на изхода от терапията при конкретни пациенти чрез анализ на индивидуалната вариантност, придаваща по-добра толерантност към фино дозирана хронотерапия или към терапия с максимално поносими дози противоракови агенти.

51. Chakarov S, Petkova R, Russev GCh. DNA repair systems. *BioDiscovery* 2014; 13: 2; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2014.13.2.

Чакъров С, Петкова Р, Русев ГХ. Системи за поправка на ДНК. *BioDiscovery* 2014; 13: 2; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2014.13.2.

Настоящият обзор разглежда подробно механизмите на поправка на различни типове увреждания в ДНК и директните молекулни участници в този процес (ензими, катализиращи поправката на увреждането или маркиращи местата на увреждане с цел по-нататъшна обработка, сензорни молекули за наличие на увреждане, други сигнализационни и ефекторни молекули). Разгледани са генетичните основи на заболявания и състояния, свързани с дефекти на поправката на ДНК, от „класическите“

тежки заболявания като xeroderma pigmentosum и синдром на Cockayne до леко или субклинично протичащите синдроми на UV-чувствителност. Обзорът анализира основните молекулни механизми на относително редките моногенни заболявания на ДНК поправката и поддръжката на геномния интегритет; на често срещаните мултифакторни заболявания и състояния с късно начало, които са свързани с увеличени нива на окислителен стрес (метаболичен синдром, диабет тип 2, сърдечно-съдови заболявания) и на състоянията, свързани с натрупване на увреждания в ДНК (фенотипове на нормално и патологично стареене, различни типове рак). Дискутирана е ролята на контролните пунктове при деленето на клетката и механизмите на вземане на решение за съдбата на клетки с увреждания от гледна точка на клетъчната хомеостаза в нормални и туморно трансформирани тъкани. Ролята на ключово важни сигнални и ефекторни молекули, активирани във връзка с наличието на увреждане в ДНК (p53, ATM, поли-(АДФ-рибозо)-полимераза, ДНК-зависима протеинкиназа, BRCA белтъци, ретинобластомен белтък и др.) е обсъдена в контекста на нормалната физиология и от гледна точка на патологията и е илюстрирана с подходящи примери. Поправката на ДНК и програмираната клетъчна смърт са разгледани като общ механизъм за ограничаване на присъствието на увредени клетки и клетки с потенциално онкогенни промени в многоклетъчните организми. Специално внимание е отделено на стареенето като естествено явление и като адаптивен еволюционен механизъм, с кратко описание на т. нар. „успешно стареене“. Описани са различията в скоростта на поправка на ДНК в транскрибираните и нетранскрибираните участъци на генома и специфичните особености на профила на поправката в някои типове клетки (терминално диференцирани клетки, плурипотентни стволови клетки и др.) и при някои таксономични групи (напр. „парадокс на поправката при гризачи“). Тези феномени са дискутирани от гледна точка на репликативното стареене и еволюционните процеси на микро – и макрониво. Разгледана е подробно ролята на поддържане на генетичното разнообразие в хода на индивидуалното развитие и във филогенетичен план, както и феноменологията на молекулярната еволюция в реално време.

52. Vlaykova T, Kurzawski M, Tacheva T, Dimov D, Gulubova M, Yovchev Y, **Chakarov St**, Drozdik M. Investigation of the role of MMP3 -1171insA polymorphism in cutaneous malignant melanoma – A preliminary study. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2014; 28(5):904-910.

Влайкова Т, Куржавски М, Тачева Т, Димов Д, Гълъбова М, Йовчев Й, **Чакъров Ст**, Дрозджик М. Изследване на ролята на полиморфизма MMP3 -1171insA при злокачествен кожен меланом – предварителни проучвания. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2014; 28(5):904-910.

Злокачественият кожен меланом е един от най-агресивните типове рак на кожата. Смъртността сред пациентите е много висока по целия свят. Разграждането на базалните мембрани и извънклетъчния матрикс е основен механизъм при инвазия на съседни тъкани и метастазиране. Матриксните металопроотеинази (MMPs) и техните тъканни инхибитори (TIMPs) играят ключова роля в този механизъм. MMP-3, наричан още и стромелизин 1 беше една от първите протеинази, за които беше установена асоциация с туморния растеж. В гена, кодиращ белтъка MMP-3 (MMP3) беше намерена инсерция/делеция на А в позиция -1171 в промоторния участък на гена, която засяга нивото на експресия на гена. Целта на настоящото пилотно изследване беше да се проучи връзката между полиморфизма MMP3 -1171insA с злокачествения меланом на кожата в група български пациенти (n=26) и здрави контроли (n=172). Изследваната от нас извадка от генотипове се подчиняваше на закона на Hardy-Weinberg. Резултатите не показаха статистически значима разлика в алелните честоти и честотата на срещане

на генотиповете на полиморфизма MMP3 -1171insA при пациентите с меланом и здравите контролни индивиди при първични анализ ($p=0.360$ и 0.790 , χ^2 -тест), както и при подбор на пациенти и контроли по възраст и пол. Сравнението на някои клинични характеристики между пациентите с различни генотипове показва по-висока преживяемост при пациентите с генотип 6A/6A в сравнение с пациентите – носители на алела 5A (5A/5A+5A/6A genotypes, $p=0.118$, Log rank тест). Резултатите от настоящото предварително проучване не подкрепят ролята на промоторния полиморфизъм -1171insA в гена MMP3 като рисков фактор за развитие на кожен меланом, но е възможно този полиморфизъм да има значение за прогресията на заболяването.

53. Tacheva T, Chelenkova P, Dimov D, Chakarov I, Petkova R, **Chakarov St**, Vlaykova T. Frequency of the common promoter polymorphism MMP2 -1306 C>T in a population from central Bulgaria. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2015; 29(2):351-356.

Тачева Т, Челенкова П, Димов Д, Чакърров И, Петкова Р, **Чакърров Ст**, Влайкова Т. Честота на промоторния полиморфизъм MMP2 -1306 C>T в популация от централна България. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2015; 29(2):351-356.

Матриксните металопротеинази (MMP) са фамилия високохомоложни извънклетъчни Zn^{2+} -зависими ендопептидази, познати също под името матриксини. Счита се, че MMP-2 (желатиназа А) и MMP-9 (желатиназа В) играят ключова роля в редица физиологични процеси, както и в развитието и прогресията на множество патологични състояния. Повечето от гените, кодиращи MMP, включително MMP-2, показват високо ниво на полиморфизъм. Един от еднонуклеотидните полиморфизми с функционална активност в промоторния участък на MMP2 е транзицията MMP2 1306C>T (rs243865). Целта на настоящото изследване беше да се оцени алелната честота и честотата на срещане на генотиповете на често срещания промоторен полиморфизъм 1306C>T в гена MMP2 при 75 индивиди от централна България и да сравним нашите резултати с тези от други популационни проучвания. Установихме, че 76.0% от случайно подбраните индивиди в извадката са носители на генотипа СС, 17.3% - на генотипа СТ и 6.7% на генотипа ТТ. Честотата на по-рядко срещания алел беше 15.3%. Така получените честоти за срещане на генотипове се различаваха от получените за други популации от Индоевропейската раса (USA - 55/38/7, MAF 26%; Холандия - 52.8/40.5/6.7, MAF 26.9%; Австрия - 55.6/35.5/8.9, MAF 27.2%), но бяха близки до стойностите, публикувани за разпределението на честотите в световен мащаб (75.3/21.3/3.4, MAF 14%).

54. Belouhova M, Schneider I, **Chakarov St**, Ivanova I, Topalova Y. Microbial community development of biofilm in Amaranth decolorization technology analysed by FISH. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2014; 8(4):635-642.

Белоухова М, Шнайдер И, **Чакърров Ст**, Иванова И, Топалова Я. Анализ чрез FISH на микробното съобщество на биофилми при обезцветяване на Амарант. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2014; 8(4):635-642.

Целта на проучването беше да се изясни ролята, пространственото разпределение и взаимоотношенията между бактерии от р. *Pseudomonas* в биофилми в хода на обезцветяваща технология към Амарант с полупрекъснат процес в моделни пясъчни биофилтри. Изследваните параметри на процеса бяха, както следва: технологични параметри; ключови ензимни активности (азоредуктаза, сукцинат дехидрогеназа, катехол-1,2-диоксигеназа, катехол-2,3-диоксигеназа); брой азоразграждащи бактерии и бактерии от р. *Pseudomonas* (определени чрез plate count техника); количеството и разположението на бактерии от р. *Pseudomonas* чрез флуоресцентна ин ситу хибридизация (FISH). Резултатите показаха, че скоростта на

обезцветяване на багрилото Амарант нараства със 120 %, което е придружено от увеличение на ензимните активности в биофилма (25.90% на азоредуктазната активност и 10.61% на сукцинатдеhidрогеназната активност). Определянето на ензимни активности показва липса на активност на катехол-1,2-диоксигеназата и на катехол-2,3-диоксигеназата в ранната фаза и високи активности на същите диоксигенази в късните фази (2.76 и 1.74 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ белтък, съответно). В началото на процеса (0-191 h) броят на култивируемите микроорганизми от р. *Pseudomonas* се увеличи с 48.76%, но в късната фаза (191-455 h) този брой намаля с 15.25%, като в същото време количеството на некултивируемите синергични бактерии от този род се увеличи с 23.26%. Чрез FISH бяха установени доминантните микробни фактори в структурата на биофилма в хода на азо-деградацията. Бяха изяснени присъщите механизми за увеличение на скоростта и обхвата на детоксикацията в рамките на комплексен процес за обезвреждане на отпадни води.

55. Chelenkova P, Petkova R, **Chakarov S.** Individual capacity for maintenance of genomic integrity - a novel tool in the assessment of the risk for common adult-onset human diseases and conditions and their late complications. *Ann Sofia Univ*, 2015, 100(4): 110-117.

Челенкова П, Петкова Р, **Чакъров С.** Индивидуалният капацитет за поддръжка на геномния интегритет като нов инструмент в оценката на риска от развитието на често срещани болести и състояния с късно начало при човека и техните потенциални усложнения. *Ann Sofia Univ*, 2015, 100(4): 110-117.

Доскоро, често срещаните болести и състояния с късно начало (затлъстяване; инсулинова резистентност; диабет тип 2; атеросклероза; сърдечно-съдови заболявания; дегенеративни заболявания на ставите; неврологични заболявания; някои типове тумори, и др.) бяха считани до голяма степен на кумулативен резултат от особености в начина на живото, независимо че отдавна е известно, че голяма част от тези заболявания показват тенденция за фамилност. Вече се знае, че генетичното предразположение играе значителна роля за формирането на риска от болести с късно начало, като някои фактори на околната среда (особености на диетата и двигателния режим, тютюневия дим, UV облъчване, и др.) могат да увеличат или намалят риска, обусловен от генетичния „багаж“ на индивида. Настоящата работа анализира основните ефекти на носителството на често срещани полиморфизми в гени, кодиращи белтъци, които участват в детекцията на увреждания в ДНК и свързаната с това сигнализация, поддръжка на геномния интегритет (TP53 P72R, XPC ins83); специфични механизми за поправка на ДНК - NER (XPC ins83, ERCC1 C8092A; XPD Lys751Gln), BER (XRCC1 Arg399Gln), поправка на скъсвания (XPCC1 Arg399Gln; XRCC3 Thr241Met) и нарушения на метилирането на ДНК (MTHFR C677T) при клинично здрави индивиди и при пациенти със специфични заболявания с късно начало. Провеждането на изследвания на нормалната вариантност на тези полиморфизми може да бъде полезно при по-нататъшна оценка на риска от често срещани заболявания с късно начало и за индивидуализация на терапии.

56. Arabadjiiev B, Petkova R, **Chakarov S**, Pankov R, Zhelev N. We heart cultured hearts. A comparative review of methodologies for targeted differentiation and maintenance of cardiomyocytes derived from pluripotent and multipotent stem cells. *BioDiscovery* 2014; 14: 2; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2014.14.2.

Арабаджиев Б, Петкова Р, **Чакъров С**, Панков Р, Желев Н. Сравнителен преглед на методологиите за насочена диференциация и поддръжка *in vitro* на кардиомиоцити, получени от плурипотентни и мултипотентни стволови клетки. *BioDiscovery* 2014; 14: 2; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2014.14.2.

Човешките клетъчни линии, включително болестните линии са в голяма част от случаите по-подходяща моделна система от животинските модели за целите на бърза и безопасна оценка на потенциалните ефекти от различни агенти, които влияят върху функцията на миокарда във физиологични и патологични условия. Към момента са разработени няколко методологии за получаване на клетки с фенотип на кардиомиоцити чрез насочена диференциация от плурипотентни клетки и чрез репрограмизиране/трансдиференциация от други клетъчни типове (мултипотентни прогениторни клетки, соматични клетки и др.). Настоящата работа разглежда потенциалните източници на клетки, които са способни да се диференцират до кардиомиоцити; разработените до момента методологии за насочена диференциация с техните специфични особености и маркерите за диференциация в посока мезодермална и кардиогенна линия. Добивът на трайно и ритмично съкращаващи се клетки рядко надвишава 70-90 % при всеки от изброените методологии, дори и при прилагане на сравнително новите методологии за повишаване на капацитета за диференциация. Все още има и значителен разноразличност в резултатите, получени от различните изследователски групи и даже между отделните експерименти, проведени в една и съща лаборатория, с един и същ тип клетки и с един и същ протокол за диференциация. Разработването на стандартизирани протоколи за получаване на нови линии от човешки плурипотентни и мултипотентни стволови клетки в напълно дефинирани условия и без контакт с продукти от животински произход може значително да увеличи надеждността и възпроизводимостта на резултатите и да ускори развитието на потенциални клинични приложения на клетъчните продукти.

57. Petkova R, **Chakarov S**. The final checkpoint - cancer as an adaptive evolutionary mechanism. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2016; 30(3): 434-442.

Петкова Р, **Чакъров С**. Ракът като адаптивен еволюционен механизъм - последният контролен пункт. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2016; 30(3): 434-442.

Съчетаното действие на поправката на увреждания в ДНК и механизмите на програмирана клетъчна смърт обикновено се справя много ефективно с ежедневно възникващите увреждания в ДНК. Когато, обаче, клетки с увредена ДНК по някаква причина оцелеят въпреки императива да спрат да се делят и, в крайна сметка, да умрат, се появява биологичното явление рак. Борбата с уврежданията в ДНК, които имат потенциал да променят нейната последователност и/или структура през време на живота на индивида и, аналогично, през времето на съществуването на биологичния вид се контролира от набор от все по-широкомащабни контролни пунктове, чийто обхват и продължителност на действие прогресивно нарастват. Те започват със системната поправка на уврежданията в ДНК и преминават през програмираната клетъчна смърт, стареенето на организма и, в крайна сметка, завършват с рака. Тези контролни пунктове обслужват различни цели и упражняват действието си на различни нива на развитие, охранявайки по този начин интегритета на генетичния „багаж“ на отделния индивид, генетичното разнообразие в популациите, и, като най-високо ниво – запазването на различните видове и на живота на Земята.

В светлината на предлаганата от нас теория за рака като последен контролен пункт, като природен закон, който предотвратява възможността сложните живи организми да живеят неограничено дълго време с цената на потенциална генетична стагнация и/или изчезване на популации и видове, фактът, че всички, дори и най-модерните антиракови терапии в крайна сметка завършват с неуспех, е напълно обясним и в реда на нещата. Съвременната медицина, обаче, има потенциала в близко бъдеще да е способна да забави прогресията на рака до терминални стадии до степен продължителността и качеството на живота на засегнатите от рак индивиди да стане сравнима с тази, която се наблюдава при нормалния процес на стареене.

58. Petkova R, Dimitrova V, Zhelev N, **Chakarov S.** An old wives' tale. Reproductive outcomes in pregnant women aged 35 or older: the role of individual repair capacity. *BioDiscovery* 2015; 18: 2; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2015.18.2

Петкова Р, Димитрова В, Желев Н, **Чакъров С.** Роля на индивидуалния репаративен капацитет за репродуктивните резултати при жена на възраст ≥ 35 години. *BioDiscovery* 2015; 18: 2; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2015.18.2

Все повече семейства отлагат във времето раждането на първото си дете. При жените на възраст ≥ 35 години често времето, което минава от началото на опитите за зачеване до забременяване е по-дълго, отколкото при младите жени и поради това тези жени често се насочват към специалисти по фертилитет. Значителна част от жените на възраст ≥ 35 години, обаче, зачеват спонтанно в рамките на 6-месечен период след началото на опитите за зачеване, подобно на по-младите жени. При бременностите, при които майката е ≥ 35 -годишна възраст към термина има по-висок риск от загуба на плода, хромозомни болести, усложнения на бременността, преждевременно раждане и ниско тегло на детето при раждането. Тези проблеми, обаче, не са редки и при по-младите жени. Това поставя въпроса доколко възрастта при „възрастните“ бременни жени е сама по себе си фактор за неблагоприятен изход от бременността или влиянието на възрастта е свързано по-скоро с повишена честота на други фактори, които повишават риска от усложнения на бременността. Възможно е индивидуалният риск от усложнения на бременността при възраст на майката ≥ 35 години да се окаже не проста функция на възрастта, а следствие от генетичния „багаж“ на родителите. Натрупана е значително количество предварителна информация, че индивидуалният капацитет за поправка на увреждания в ДНК играе роля за плодовитостта при жената и способността ѝ да износи бременността до термин. Малки унаследени различия в капацитета за поправка на ДНК често нямат значителен ефект при младите бременни, но могат да са от значение при по-възрастните жени. Изходът от бременността при жени ≥ 35 -годишна възраст към термина зависи от здравния статус на жената преди забременяването и от качеството на пренаталната грижа, и може да не се различава значително от изхода при по-млади жени.

59. Tacheva T, Dimov D, Chelenkova P, Petkova R, **Chakarov S**, Vlaykova T. MMP2 -1306C>T polymorphism in patients with COPD. Scripta Scientifica Pharmaceutica 2016, vol. 3, No. 1, 2016, 13-20.

Тачева Т, Димов Д, Челенкова П, Петкова Р, **Чакъров С**, Влайкова Т. Полиморфизмът MMP2 -1306C>T при пациенти с ХОББ. Scripta Scientifica Pharmaceutica 2016, vol. 3, No. 1, 2016, 13-20.

Ремоделирането на бронхиалната стена е важен механизъм в патофизиологията на ХОББ. Матриксната металопротеиназа-2 (MMP-2) играе роля в този процес.

Целта на настоящото изследване беше да се изясни потенциалната роля на промоторния полиморфизъм MMP2 -1306C>T като рисков фактор при ХОББ. Изследвахме чрез PCR-RFLP 84 пациента с ХОББ и 71 клинично здрави контроли.

Разпределението на генотиповете се различаваше между пациентите с ХОББ и здравите контроли ($p=0.021$ и 0.602 , съответно). Алелната честота не се различаваше значително между двете групи. Носителите на генотипове, съдържащи вариантния алел Т (СТ+ТТ) показаха 1.64 пъти увеличен риск за развитие на ХОББ (OR (odds ratio)=1.64, 95% CI: 0.82-3.26, $p=0.164$) от индивидите-носители на генотипа СС. Този риск се оказва значителен при индивидите на възраст над 65 години (OR=4.24, 95% CI: 1.31 - 13.57, $p=0.019$). При пациентите с генотипове, съдържащи алела Т (СТ+ТТ) се наблюдаваше по-късно начало на заболяването (64.1 ± 7.1 години), отколкото при тези с генотип СС (59.7 ± 9.5 години, $p=0.045$). Рискът от развитие на ХОББ за носителите на генотипове с Т алели (СТ+ТТ) беше значителен и в индивидите без диабет. Нашите резултати показват, че носители на генотипове, съдържащи алела Т (СТ+ТТ) на еднонуклеотидния полиморфизъм MMP2 -1306C>T имат по-висок риск от развитие на ХОББ с напредване на възрастта.

60. Chelenkova P, Petkova R, Chamova T, Zheliazkova S, Tournev I, **Chakarov S**. Carriership of the variant alleles of APOE (E2, E4) may be associated with gender-dependent modulation of the risk for cerebrovascular incidents in the Bulgarian population. Compt Rend Bulg Acad Sci 69:12, 2016, 1533-1540.

Челенкова П, Петкова Р, Чамова Т, Желязкова С, Търнев И, **Чакъров С**. Носителството на вариантни алели на полиморфизма АРОЕ (Е2, Е4) може да е свързано със зависима от пола модулация на риска за мозъчно-съдови инциденти в българската популация. Compt Rend Bulg Acad Sci 69:12, 2016, 1533-1540.

Аполипопротеин Е (АРОЕ) е плазмен белтък, участващ в транспорта на липиди. Към момента са познати не по-малко от шест алела на гена. Три от тези вариантни алели - Е2, Е3 и Е4 - се срещат често във всички популации. В литературата съществува значително количество данни, че рискът от съдови заболявания е увеличен при носителите на алела Е4 (вероятно във връзка с асоциацията между Е4 и повишени нива на холестерола в плазмата), докато ефектът на носителството на Е2 е по-слабо проучен. Нашите резултати показват, че носителството на единичен Е4 алел на гена АРОЕ не оказва значителен ефект върху риска от мозъчно-съдови инциденти при жени-носителки, но може слабо да повиши риска при мъжете-носители на Е4. Хетерозиготното носителство на алела Е2 може да бъде свързано с понижен риск от мозъчно-съдови инциденти в българската популация, като това понижение отново е свързано с пола (ефектът е по-изразен при мъжете-носители в сравнение с жените-носителки). Тези ефекти може да са свързани с модулиращия ефект на вариантните алели на АРОЕ върху нивата на тоталния и LDL холестерол.

61. Petkova R, Chelenkova P, Tournev I, **Chakarov S.** The minus of a plus is a minus. Mass death of selected neuron populations in sporadic late-onset neurodegenerative disease may be due to a combination of subtly decreased capacity to repair oxidative DNA damage and increased propensity for damage-related apoptosis. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2016;30(4), 623-643.

Петкова Р, Челенкова П, Търнев И, **Чакъров С.** Измирането на специфични невронни популации при спорадично възникващите случаи на невродегенеративни заболявания може да е свързано с леко намален капацитет за поправка на окислителни увреждания в ДНК, съчетано с увеличен капацитет за апоптоза на увредени клетки. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2016;30(4), 623-643.

Невроните в централната нервна система (ЦНС) на възрастните индивиди са подложени на високи нива окислителен стрес. Уврежданията, предизвикани от това обикновено бързо и ефективно се поправят. Транскрибираните геномни региони се поправят приоритетно спрямо нетранскрибираните. Приоритизацията на поправката на ДНК в диференцираните неврони е свързана с промени на информацията, която се подава на системата за оценка на геномния интегритет с цел отлагане на програмираната клетъчна смърт вследствие на увреждане, освен ако увреждането не засяга директно функционирането на неврона.

Невроните в ЦНС могат да бъдат подменени, но това се извършва бавно и рядко. Прекомерната стимулация на нишата на невралните прогенитори при възрастните индивиди, предизвикана от ускорена загуба на неврони може да доведе до преждевременно изчерпване на прогениторите в нишата. Комбинацията от двата патологични механизма (увеличено загиване на увредени неврони и изчерпване на нишата прогениторни клетки) може в крайна сметка да доведе до необратима загуба на специфични невронални популации и/или генерализирана загуба на неврони от ЦНС. В настоящата работа ние излагаме хипотеза, че рискът от развитие на спорадично (нефамилно) невродегенеративно заболяване може да зависи и от индивидуалния капацитет за детекция и поправка на ДНК увреждания и генетично заложен капацитет за преценка на дадено ниво на увреждания като поправимо (активиране на системата за поправка) или непоправимо (активиране на програмираната клетъчна смърт). По този начин, леки дефицити в системата за детекция и поправка на увреждания в ДНК, съчетани с преференция за поправка на уврежданията могат да доведат до повишен риск от неопластични заболявания; докато същите или други леки дефицити на поправката на ДНК, съчетани с подчертана тенденция за унищожаване на увредените клетки могат да доведат до повишаване на риска от невродегенеративни заболявания. Необходими са подробни изследвания, за да може тази хипотеза да бъде проверена и, евентуално, резултатите от тези изследвания да бъдат използвани за оценка на риска от често срещани заболявания с късно начало при човека.

62. Chelenkova P, Petkova R, Chamova T, Zheliazkova S, Tournev I, **Chakarov S.** Polymorphisms in genes coding for major DNA repair proteins XPC, XPD and XRCC3 may modulate the risk for cerebrovascular incidents in the Bulgarian population. *Ann Sofia Univ* 2016 101(4), 116-124.

Челенкова П, Петкова Р, Чамова Т, Желязкова С, Търнев И, **Чакъров С.** Полиморфизми в гените, кодиращи ключовите белтъци на ДНК поправката XPC, XPD and XRCC3 могат да влияят върху риск от мозъчно-съдови инциденти в българската популация. *Ann Sofia Univ* 2016 101(4), 116-124.

Еукариотните клетки са подложени всеки ден на високи нива генотоксичен стрес. При младите и здрави индивиди предизвиканите от това увреждания се поправят практически без остатък. С напредване на възрастта, ефективността на ДНК поправката

намалява и нивата на непоправени увреждания в ДНК започват да нарастват. Това, от своя страна, ускорява репликативното стареене и/или клетъчната смърт в стареещите тъкани. Носителството на вариантни алели на гени, кодиращи белтъци, които са отговорни за идентификация на увреждания в ДНК и тяхната поправка може да бъде свързано с леко намаление на ефективността на поправката на ДНК и намален капацитет за подновяване на клетките и тъканите. Това може да увеличи риска от развитие на дегенеративни заболявания. Настоящата работа анализира връзката между носителството на вариантни алели на някои често срещани полиморфизми в гени, кодиращи белтъци от поправката с изрязване на нуклеотиди (XPC ins83, XPD (ERCC2) Lys751Gln), поправката на скъсвания в ДНК чрез хомоложна рекомбинация (XRCC3 Thr241Met), свързаната с наличие на увреждане сигнализация и оценка на нивата на увреждане (TP53 Pro72Arg), от една страна, и риска от мозъчно-съдови инциденти при български пациенти, от друга страна. Нашите резултати показват статистически значими отклонения от равновесието на Hardy-Weinberg при групата пациенти с мозъчно-съдови инциденти и здравите контроли по отношение на маркерите XPC ins83, XPD Lys751Gln и XRCC3 Thr241Met. Едновременното носителство на „про-апоптотичния“ 72Arg алел на полиморфизма TP53 Pro72Arg и „високорисковите“ вариантни алели на другите три полиморфизма беше значително по-високо при пациентите с история за мозъчно-съдови инциденти, отколкото при клинично здрави контроли на същата възраст. Носителството на вариантни алели на полиморфизмите XPC ins83, XPD Lys751Gln и XRCC3 Thr241Met и про-апоптотичния алел 72Arg може да представлява допълнителен рисков фактор за възникване на мозъчно-съдови инциденти в българската популация.

63. Svetlana I. Ivanova, **Stoyan Chakarov**, Albena Momchilova, Roumen Pankov. Live-cell biosensor for assessment of adhesion qualities of biomaterials. *Materials Science and Engineering*: C. 2017; 78: 230-238.

Светлана И. Иванова, **Стоян Чакърров**, Албена Момчилова, Румен Панков. Биосензор на основа живи клетки за оценка на адхезионните качества/повърхностна биосъвместимост на биоматериали. *Materials Science and Engineering*: C. 2017; 78: 230-238.

Настоящата работа описва биосензор на основа живи клетки, подходящ за оценка на адхезионните качества на различни субстрати. Биосензорът е разработен на основа NIH/3T3 фибробластна клетъчна линия, стабилно експресираща фузионните флуоресцентно белязани белтъци mCherry-винкулин и GFP-тензин като околичествяеми маркери не само на фокалните, но също така и за фибриларните междуклетъчни контакти. С цел стандартизация на адхезията на биосензорните клетки бяха използвани четири измерими параметъра – спрединг, поляризация и развитие на фокални и фибриларни междуклетъчни контакти след платиране върху пет субстрата от естествен произход – фибронектин, витронектин, ламинин-111, ламинин-521 и колаген тип I. Получените данни бяха използвани за описание на нормалното поведение на клетките на биосензора и като стандарт за оценка на повърхностната биосъвместимост на материали с неизвестни адхезивни качества. За оценка на приложимостта на биосензора бяха изследвани два изкуствени материала, основани на PDMS. Резултатите показаха по-висока повърхностна биосъвместимост на полиакриловия кополимер на PDMS (PDMS-РАА) в сравнение с поливинилпириролидоновия кополимер (PDMS-PVP). Формирането на фокалните адхезивни контакти би могло евентуално да бъде използвано като параметър за оценка при по-нататъшни изследвания.

64. Ivanova SI, **Chakarov SA**, Pankov R. Formation of fibrillar adhesions correlates with spreading but does not depend on cell polarization. *Compt Rend Acad Bulg Sci* 2018 (in press)

Иванова СИ, **Чакъров СА**, Панков Р. Образоването на фибриларни адхезионни контакти има връзка с разстилането на клетките, но не и с клетъчната поляризация. *Compt Rend Acad Bulg Sci* 2018 (in press)

Разработването на нови биоматериали изисква познаване на факторите, които направляват клетъчната адхезия. В настоящата работа беше изследвана зависимостта на формиране на фибриларните адхезионни контакти от разстилането на клетките върху субстрата, поляризацията и формирането на фокални контакти. Използвани бяха биосензор на основа живи клетки за оценка на повърхностната биосъвместимост и покрити с фибронектин гъвкави субстрати. Установено беше, че формирането на фибриларни адхезионни контакти зависи от степента на разстилане на клетките върху субстрата, но не и от клетъчната поляризация.

65. Petkova R, **Chakarov S**. [No] Need for Speed. Late-onset diseases as evolution's power brakes. An authors' commentary to "Petkova R, Chakarov S. The final checkpoint. Cancer as an adaptive evolutionary mechanism", published in *Biotech Biotech Equip* 2016;30(3):434-442. *Cell Dev Biol* 7: 194. DOI: 10.4172/2168-9296.1000194

Петкова Р, **Чакъров С**. Заболяванията с късно начало в ролята на „аварийна спирачка“ на еволюцията. Late-onset diseases as evolution's power brakes. Авторски коментар на „Петкова Р, **Чакъров С**. Ракът като адаптивен еволюционен механизъм - последният контролен пункт“. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2016; 30(3): 434-442. *Cell Dev Biol* 7: 194. DOI: 10.4172/2168-9296.1000194

Дегенеративните заболявания и ракът са водещите причини за смъртност в зряла и напреднала възраст и по всяка вероятност тази тенденция ще продължи такива в близко бъдеще. Съвременната медицина разполага с внушителен набор от методи и инструменти за откриване, мониторинг и контрол на редица заболявания и състояния, включително заболявания с късно начало. Тези заболявания, обаче, много рядко биват излекувани напълно. Защо, в крайна сметка, се провалят усилията на изследователи и клиницисти, въпреки всичките усилия, насочени в тази област? Възможно е да се окаже, че се опитваме да борим с природен закон, който е бил заложен от природата с точната цел да се осигури достатъчно широк фронт за развитие на еволюцията, но в същото време да се предотврати нейното прекомерно ускоряване. Наскоро, ние представихме хипотезата, че „смъртта от старост“ и ракът могат да бъдат разглеждани като природни механизми или „контролни пунктове“ от по-високо ниво, които поддържат оптимална скорост на еволюцията и запазват популацията и вида за сметка на отделни индивиди. В този момент на развитие, човекът не е способен да промени природните закони. В наша власт е, обаче, да предвиждаме, профилактираме, отлагаме и да модифицираме изхода на голяма част от болестите с късно начало. За тази цел е необходимо да продължаваме изследователската дейност и разработването на приложни инструменти за диагностика и лечение на заболяванията с късно начало и за подобряване на качеството на живот на пациентите.

66. Petkova R, Zhelev N, Pankov R, **Chakarov S.** Potential uses of stem cell lines for clinical applications - a matter of (genomic) integrity. Biotech Biotech Equip 2018 (in press)

Петкова Р, Желев Н, Панков Р, **Чакъров С.** Потенциалът за използване на стволовите клетъчни линии за клинични приложения е свързан с геномния интегритет. Biotech Biotech Equip 2018 (in press)

Публичните и частните банкиращи клетки и клетъчни линии съхраняват и поддържат стотици хиляди частично охарактеризирани клетъчни популации, включително значителен брой човешки плурипотентни стволово-клетъчни линии. Безопасността за реципиента е ключово важен фактор при оценката за приложимост на препаратите от стволови клетки за клинични цели. С развитието на методологиите за получаване *in vitro*, поддръжка *ex vivo* и намножаване на стволови клетки, както и за насочена диференциация на мултипотентни и плурипотентни стволови клетки, към и без това дългия списък от потенциални проблеми, свързани с използването на препарати от клетки и тъкани се прибавиха и нови. Тези нови проблеми се дължат основно на рисковете, свързани с потенциалните промени, които настъпват в процеса на култивиране на клетките и получените от тях клетъчни продукти, както и как тези промени биха могли да се отразят на качеството на препарата и евентуалните ефекти върху реципиента. Към момента, в специализираната литература има публикувани ограничен брой изследвания на ролята на индивидуалния капацитет за поправка на ДНК при линии от стволови клетки, поддържани *in vitro*. Оценката на индивидуалния репаративен капацитет може да играе ключово важна роля за безопасността на използване на човешки стволови клетки, тъй като съставлява важен рисков фактор за възникване на геномни промени, които могат да компрометират качеството на клетъчния продукт. Настоящият обзор обобщава и анализира наличните данни за ролята на капацитета за поправка на ДНК и поддръжка на геномния интегритет при различни типове стволови клетки и потенциалните нежелани ефекти, които могат да се проявят при по-нисък от нормалния капацитет за поправка на генотоксични увреждания в ДНК при клетъчни препарати, предназначени за трансплантационни цели.

67. Chelenkova P, Petkova R, Chamova T, Zhelyazkova S, Tournev I, **Chakarov S.** The fine art of vessel wall maintenance. Individual capacity to manage oxidative damage plus susceptibility to cerebral amyloidosis may play a role in the constitution of the risk for cerebral vascular accidents in the Bulgarian population. Biotech Biotech Equip 2018 (in press).

Челенкова П, Петкова Р, Чамова Т, Желязкова С, Търнев И, **Чакъров С.** Индивидуалният капацитет за поправка на окислителни увреждания и склонността към церебрална амилоидоза може да модифицира риска от мозъчно-съдови инциденти в българската популация Biotech Biotech Equip 2018 (in press).

Подмяната на увредения ендотел на кръвоносните съдове може да е недостатъчно ефективна, когато съдовата стена е подложена на трайно повишено ниво на окислителен стрес. Носителството на генетични фактори, които водят до капацитет за поправка на ДНК по-нисък от средния може да доведе до трайно повишаване на нивата на окислителен стрес. Единадесет ДНК полиморфизма, от които 7 ДНК полиморфизма в гени, кодиращи белтъци на ДНК поправката и поддръжката на геномния интегритет, 3 маркера, свързани с риска от хиперкоагулабитет и 1 маркер, свързан с риск от церебрална амилоидоза бяха изследвани при възрастни български пациенти с един или повече мозъчно-съдови инцидента (МСИ), както и при подбрани по възраст и пол здрави контроли. Беше намерено, че носителството на генотипа *del/del* на маркера *XPC ins83* е свързано с понижаване на риска от МСИ (RR=0.446, 95 % CI:0.225 - 0.886, p=0.021). За едновременното носителство на този генотип и на

генотипа Arg/Arg по маркера *TP53 Pro72Arg* беше намерена връзка с повишен риск от МСИ (RR=1.845, 95 % CI:1.049-3.244, p=0.034). За носителството на генотипа Lys751Gln по маркера *ERCC2* беше намерен повишен риск от МСИ (RR=2.055, 95 % CI:1.09-3.876, p=0.025). За мъжете-носители на генотипа E2/E3 по маркера *APOE* беше намерен понижен риск от МСИ (RR=0.279, 95 % CI:0.090-0.873, p=0.028). За мъжете-носители на *APOE4* алела беше намерен повишен риск от МСИ. Според нашите резултати, носителството на често срещаните протромботични рискови фактори Factor V Leiden, *PT G20210A*, *MTHFR C677T* и *PAII 4G/5G* не оказва значим ефект върху риска от МСИ при българските пациенти.

II. Публикувани пълни текстове в сборници от доклади от конгреси

1. V. Ganey, I. Paskaleva, S. Kirov, M. Marianu, A. Goudev, S. Chakarov, I. Kremensky, L. Sirakov (1995). Early detection of patients with familial hypercholesterolemia. Proceedings of the First Bulgarian International Symposium on Cardiovascular Diseases and Pediatric Trauma, pp. 53-59.

В. Ганев, И. Паскалева, С. Киров, М. Мариану, А. Гудев, С. Чакъров, И. Кременски, Л. Сираков (1995). Ранна идентификация на пациенти с фамилна хиперхолестеролемиа. Proceedings of the First Bulgarian International Symposium on Cardiovascular Diseases and Pediatric Trauma, pp. 53-59.

2. Боновска М, Христова В, Кандов П, Караиванов Л, Бъчварова Я, Чакъров Ст (1998). Използване на PCR в рутинни бактериологични лаборатории за бързо откриване на *Mycobacterium bovis*. Сб. 9. нац. Конгрес по микробиология, 15-17 Окт. София, стр. 228-231.

Туберкулозата по говедата е инфекциозна зооноза, която създава сериозен икономически и здравен проблем в стадата от едър рогат добитък в България. *Mycobacterium bovis* е бавнорастящ микроорганизъм и поради това потвърждаването на диагнозата чрез конвенционално култивиране е неприемливо продължителен процес. PCR технологията е много по-бърз и ефективен метод, който намалява времето за поставяне на диагнозата от 2-8 седмици до 2 дни. Дванадесет щама на *M. bovis*, изолирани от говеда; един от дива свиня; един ваксинален щам (*M. bovis* BCG); един щам *M. tuberculosis*; два щама *M. avium*, изолирани от домашна свиня; един щам *M. phlei* и един щам *M. fortuitum*, получени от околната среда, бяха изследвани чрез PCR и резултатите бяха сравнени с получените чрез конвенционално култивиране. Чрез PCR бяха детектирани 85.7 % от *M. bovis*. Изследването чрез PCR технология може да бъде използвано като бърз скриниращ тест в рутинната лабораторна диагностика на туберкулозата по говедата.

III. Монографии и книги

1. Стоян Чакъров, Георги Русев. (2011). ДНК поправка. Академично издателство „Марин Дринов”, София, 2011.

Поправката на ДНК е ключов процес в молекулярната биология на клетката, наред с процесите на репликация, транскрипция и трансляция. Изучаването на механизмите на този процес и на ролята му на клетъчно, организмово и популационно ниво има както фундаментално значение за медико-биологичната наука, така и практическа стойност за здравеопазването и разбиранията ни за еволюцията. Настоящата монография е първата в страната на тази тема и е една от малкото в световната научна литература. Тя е написана с висок научен професионализъм, но в същото време е четивна. Поради това, книгата ще бъде полезна както за специалисти в областта на медицината, молекулярната и клетъчната биология, генетиката и еволюционната теория, така и за студенти по медицина, биология и химия и за всички интересувани се от тези проблеми.

2. Petkova R, Chakarov S, Ganev V (2012). Chapter 3 - From Genotype to Phenotype – When the Parents Ask the Question, pp. 33-50. Hemophilia. Batorova A, Ed. ISBN 978-953-307-747-5. InTech - Open Access Publisher.

Петкова Р, Чакъров С, Ганев В (2012). От генотипа към фенотипа, или: когато родителите питат защо. Hemophilia. Batorova A, Ed. ISBN 978-953-307-747-5. InTech - Open Access Publisher. Глава 3, стр. 33-50.

Вродените разстройства на кръвосъсирването при човека се характеризират с различна тежест на клиничното протичане, която може да варира от лека до много тежка. Не винаги, обаче, клиничните прояви корелират с тежестта на молекулния дефект, причинил заболяването, особено при вродени дефицити на белтъчни фактори на кръвосъсирването, при които дори 1 - 2 % разлика в нивото на липсващия фактор може да означава огромна разлика във фенотипните прояви на болестта. Често, остатъчното ниво на дефицитния фактор не може да се използва като база за формиране на предположения за хода на клиничното протичане на болестта при съответния пациент. Това може да се дължи на редица причини, между които са обстоятелствата, при които е измерено нивото на дефицитния фактор; точност на измерването и вид на използвания лабораторен метод (еднофазен или двуфазен тест □ колориметричен метод); съотношение между антигенното съдържание и активността на изследвания фактор на кръвосъсирването; особености на молекулния дефект; наличие на фактори, утежняващи или облекчаващи хеморагичната диатеза (напр. антитела срещу дефицитния белтък, сънаследени протромботични рискови фактори) и т. н. Поради това, възможността за изготвяне на най-обща прогноза за тежестта и особеностите на клиничното протичане на хемофилията при млади пациенти може да представлява предизвикателство пред генетичния консултант. Този аспект от живота с хронично заболяване, обаче, е много важен за семействата, при които се налага генетично консултиране заради един или повече случаи на хемофилия в семейството.

Възможността за оценка на рисковете, свързани с разстройствата на кръвосъсирването често играе важна роля при формиране и поддържане на мотивацията за провеждане на адекватно лечение и участие в изпитания на нови лекарства, но също така може и да се отрази негативно, като например, да предизвика свръхпротективност на семейството към болното дете и да предизвика драстични промени в репродуктивните планове на семейството (наличието на едно болно дете, съчетано с мрачна прогноза за протичането на заболяването обикновено води до решение семейството да няма повече деца). Възможността да бъде даден отговор на

въпросите на родителите относно евентуалното протичане на заболяването с една приемливо висока степен на сигурност е критично важен компонент на генетичното консултиране при хемофилия. Това, обаче, изисква събиране и обработка на солидна маса информация, за да може да бъде създаден надежден профил на хода на заболяването, който да отразява правдиво всички рискове, които могат да се очакват и да дава възможност да бъдат избегнати нежелани инциденти.

След присъждане на академичното звание „доцент“:

3. Стоян Чакърв, Румена Петкова, Румен Панков. Стволови клетки. Първо издание - 2012, Академично издателство "Акад. Марин Дринов", ISBN 987-954-322-517-0.

Второ преработено и допълнено издание - 2014, Академично издателство "Акад. Марин Дринов", ISBN 987-954-322-798-3.

Настоящата монография разглежда биологията и особеностите на стволовите клетки, методите и подходите за тяхното охарактеризиране, изследователската дейност върху недиференцирани и диференциращи се клетки и потенциалните приложения на клетъчната терапия. Дискутирани са подробно всички по-важни аспекти на получаването, поддържането и използването на стволови клетки и клетъчни линии в съвременни условия, като специално внимание е отделено на оценката на възможностите за клетъчна терапия със стволови клетки, включително и за изготвяне на продукти за трансплантация.

Накратко е описана хронологията на откриването на стволовите клетки и техните свойства и на развитието на тази проблематика във фундаментален и в приложен аспект. Разгледана е подробно биологията на стволовите клетки; начините за контрол върху диференциацията им, както и възможностите за дедиференциация и трансдиференциация. Представени са базовите биохимични и генетични особености, както и пролиферативният им капацитет. Отделено е внимание на маркерите за недиференцирано състояние, и, респективно, за плурипотентност. Описани са различните видове стволови клетки, като ембрионални, възрастни, индуцирани плурипотентни клетки, ракови стволови клетки и пр., в съответствие с техния произход, роля и възможности за приложение. Представени са основите на съвременните схващания за съществуване на две състояния на плурипотентните стволови клетки – „наивно” и „подготвено” (за диференциация). Специално внимание е отделено на конкретните пътища за диференциация на възрастни стволови клетки. Разгледана е съвременната уредба за биобанкиране, организация на публичните и частните банки и възможностите им за подпомагане на евентуални трансплантационни процедури.

Монографията съдържа подробен преглед на необходимостта и начините за насочване към диференциация до определен клетъчен тип, което е особено важно при опити за подготовка на трансплантационни продукти. Обсъдени са подробно имунологичните аспекти. Дискутирано е актуалното състояние на възможностите на изследователското направление „стволови клетки”, както за по-нататъшно развитие на фундаменталните изследвания в областта на медико-биологическото познание, така и за многобройните очаквани от обществото приложни аспекти.

4. Khalil HS, **Chakarov S**, Zhelev N. ATM, a damage sensor and cancer target. David P. Lane, Editor. Dundee Science Press, 2014. ISBN 978-072-343-336-1.

Халил ХС, **Чакъров С**, Желев Н. АТМ като сензорна молекула за ДНК увреждане и таргет за антиракова терапия. Редактор: Дейвид Ф. Лейн. Dundee Science Press, 2014. ISBN 978-072-343-336-1.

Капацитетът на клетката да запазва и поддържа оригиналната последователност на своята ДНК е фундаментално важен за оцеляването и нормалното функциониране на целия организъм и за предпазване от неопластична трансформация. В настоящата работа ние разглеждаме получени наскоро експериментални резултати и актуални проблеми в областта на ролята на протеинкиназата АТМ (ataxia-telangiectasia mutated) като сензорна молекула за ДНК увреждане и нейният потенциал да бъде използвана като таргет за антиракова терапия. Монографичният труд дискутира механизмите за поправка на ДНК, които се активират при възникване на двойно-верижни скъсвания в ДНК и SSA и ролята на АТМ в тези видове поправка на ДНК. Освен функцията си в ДНК поправката, АТМ още участва в редица разнообразни биологични процеси, между които регулация на метаболизма, на окислителния стрес, модулация на транскрипцията, разграждането на белтъци и клетъчната пролиферация. Подробното вникване в сложните функции на АТМ и евентуалният дизайн на терапевтични средства, които модулират неговата активност с цел да бъдат използвани за борба с болестите при човека изисква обединяване на теоретичните и експерименталните изследвания. Последното може да бъде осъществено чрез приложение на системно-биологичен подход, включващ математическо моделиране на клетъчната сигнализация.

5. **Chakarov S**, Petkova R, Zhelev N, Russev G. DNA repair and individual repair capacity. David P. Lane, Editor. Dundee Science Press, 2014; ISBN 978-0-9931573-1-8.

Чакъров С, Петкова Р, Желев Н, Русев Г. ДНК поправка и индивидуален репаративен капацитет. Редактор: Дейвид Ф. Лейн. Dundee Science Press, 2014; ISBN 978-0-9931573-1-8.

Настоящият монографичен труд е посветен на една бързо развиваща се клон в модерната биомедицинска наука, а именно поправката на увредена ДНК. Голямата маса от изследователски данни, натрупана в областта на ДНК поправката е систематизирана с цел да се дефинират базовите характеристики и механизми на клетъчната машинария, участваща в поправката на увреждания в ДНК е връзката на ДНК поправката с други есенциално важни процес в живите клетки. Редица специфични проблеми в областта са дискутирани подробно от гледна точка на съвременните схващания по въпроса.

Монографията съдържа петнадесет глави, всяка от които е посветена на специфичен аспект на поправката на ДНК (типове увреждания, ензимни активности, участващи в ДНК поправката, механизми на поправка) и на свързание с това области на стареенето, програмираната клетъчна смърт и карциногенезата. Специално внимание е отделено на медицинските аспекти на нарушенията, влияещи върху капацитета за ДНК поправка, което включва както класическите моногенни заболявания, така и (xeroderma pigmentosum, синдром на Cockayne и др.), както и мултифакторните заболявания, свързани с лек дефицит на капацитета за ДНК поправка.

В началото на монографията е представен кратък преглед на събитията в научния свят, допринесли и съпътствали откритието на биологичния феномен ДНК поправка. В подробности са разгледани типовете ДНК увреждания, често срещаните увреждащи агенти и техния механизъм на действие върху ДНК, съответните типове поправка в живите организми, основните ензимни активности, които участват в поправянето на уврежданията и механизмите на поправката. Накратко са изложени основните механизми на действие на често използваните антиракови лекарства. Дискутирани са

ролята на ДНК уврежданията и тяхната поправка при здравите индивиди и при някои чести заболявания, включително и транслезионната репликация на увредени ДНК матрици като защитен механизъм при увеличен мутагенен товар на клетката.

Разгледани са основните особености на сигналните и изпълнителни молекули на ДНК поправката и свързаната с тях регулация, както и последствията от нарушенията във функцията им във физиологични и патологични условия. Описани са основните механизми на програмираната клетъчна смърт и пътищата за нейното активиране. Отделено е внимание на механизмите на нормалното и патологичното стареене и на научно и рационално обусловените подходи за повишаване на вероятността за т. нар. „успешно стареене“. Очертана е връзката между ДНК поправката и генезата на рака, основните патофизиологични механизми за неговата индукция и прогресия и ролята на намаления капацитет за поправка при млади и при възрастни индивиди.

Дискутирани са подробно и постиженията в някои специфични области, като времето и пространственото разпределение на ефективността на ДНК поправката по време на жизнения цикъл на клетката и връзката между ДНК поправка и транскрипция. Специално внимание е отделено на еволюцията на системите за ДНК поправка и на поправката като двигател на еволюцията, като дава връзката между това *как* работи ДНК поправката и *защо* работи по този начин.

Разгледани са детайлно ролята на полиморфизмите в гените, кодиращи белтъци, участващи в поправката на ДНК и поддръжката на геномния интегритет при здрави индивиди, при някои конкретни заболявания и след генотоксични терапии.

Монографията завършва с кратък преглед на методите и технологиите, използвани за оценка на капацитета за поправка на ДНК и подновяване на клетъчните популации.

Монографията може да служи като учебник или източник на допълнителна информация за студенти по медицина, молекулярна и клетъчна биология, или да бъде в помощ на специалистите, в случай на нужда от обобщена информация за съвременното състояние на областта на поправката на ДНК и най-новите теории за стареенето, карциногенезата и молекулярната еволюция. Всяка глава съдържа списък на използваната литература, който съдържа по-значителните публикации в областта и може да се използва като източник на допълнителна информация.

Монографията съдържа значително количество специализирана информация, но може да представлява интерес и за неспециалистите в областта.

IV. Учебни пособия

1. А. Ангелова, Б. Константинов, В. Ганев, Д. Демиров, И. Кременски, Ст. Чакъргов (1995). Принципи на молекулярната биология – ръководство за интензивен практически курс за преподаватели (Principles of Molecular Biology – Training Syllabus) – TEMPUS 08121/94-97.

Съвременните постижения на молекулярната биология родиха новите медицински дисциплини – молекулярната патология и молекулярната медицина. Ако допреди десет години непосредственото приложение на знанията за молекулните процеси стигаше до малък брой сравнително редки моногенни наследствени дефекти (хемоглобинопатии, няколко ензимопатии), то днес, едновременно с нанасянето на много детайли върху картата на молекулните промени на няколкостотин такива заболявания, се запълват празнините в опознаването и поставянето под контрол на голям брой често срещани и социално значими групи заболявания – дислипидемии, захарен диабет, злокачествени новообразувания, съединителнотъканни, репродуктивни и ментални заболявания. Очаква се в следващите години прилагането на молекулярно-биологични техники да стане неотменна част от работата на диагностичните – клинична, микробиологична, патоморфологична и пр. лаборатории.

Финансираният чрез програма TEMPUS тригодишен проект цели чрез съвместните усилия на преподаватели от наши висши учебни заведения, научни институти и институти на партниращи страни от Европейския съюз да се повиши квалификацията на преподаватели от предклинични и клинични дисциплини на Медицинските факултети в София и Пловдив и да се въведе стъпаловидно преподаване и обучение на студенти-медици по молекулярна биология и молекулярна патология.

Настоящият курс е първи от планираните в рамките на проекта шест практически курса по тези основни техники на молекулярната биология, които намират най-често приложение в медицинската наука и практика. Обхванати са техниките за изолиране на ДНК; характеризиране на годността на получените препарати за последващ анализ; полимеразна верижна реакция; рестрикционен анализ; хибридизационен анализ; секвениране на ДНК; хетероложна експресия.

След присъждане на академичното звание „доцент“:

2. Стоян Чакъргов. Приложна молекулярна и клетъчна биология – учебно пособие за студенти. Първо издание - 2012, Интервю Прес, ISBN 978-954-666-090-9.

Настоящото учебно пособие не представлява учебник по приложна молекулярна и клетъчна биология. В още по-висока степен то не обхваща цялото изключително широко и многопластово направление на приложната молекулярна и клетъчна биология.

На практика учебното пособие представлява допълнителни помощни материали към курса по „Приложна молекулярна и клетъчна биология“ за студенти в специалност „Молекулярна биология“. Бях натоварен от Факултетния съвет на Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски“ да разработя, въведа в учебната практика на Факултета и провеждам като титуляр този курс. Към момента на създаването на курса той е с хорариум 45 часа лекции и 30 часа упражнения.

Курсът е задължителен за студентите по молекулярна биология в Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски“ и ще се провежда в осми (последен) семестър от съответната бакалавърска програма.

Акцент в курса е: на съвременната приложна молекулярна и клетъчна биология да се гледа като на процес на изследвания, контрол и управление на информационните потоци в клетката. От една страна – в „права“ посока - стабилност и динамика на

генетичната информация и нейната реализация, и насочено манипулиране на процеса на реализация на информацията. В тази посока за курса са приети като водещи теми, свързани с анализ на нуклеинови киселини, изготвяне и приложения на рекомбинантни ДНК, РНК и белтъчни молекули, платформи за геномно секвениране, трансгенни организми и пр. От друга страна - в „обратна“ посока на информационните потоци, съществени са изследванията, контрола и управлението на сигнализацията на процеси в клетката чрез външни въздействия. В тази посока важни теми са анализ на сигнализационни каскади, стимулиране на определени клетъчни пътища, контролирана намеса в клетъчното програмиране и препрограмиране, поддържане на недиференцираното състояние на клетки и насочването им към определена посока на развитие. Обърнато е специално внимание на направлението „стволови клетки“, тъй като то може би най-динамично развиващото се и предоставя отлични възможности за работа и контрол върху диференциация и дедиференциация, и т.н.

Отделено е внимание на широкото направление „индивидуализирана медицина“, защото то е един от най-важните „таргети“ на приложната молекулярна и клетъчна биология.

Представени са най-често използваните „моделни“ организми и моделни системи.

Обърнато е внимание на еволюцията в начините на мислене в биомедицинското познание и на съвременните парадигми в тази връзка. Считаю, че една важна функция на висшето образование е формиране и развитие на начина на мислене на студентите. Това изисква и системен диалог със студентите. Не само поради необходимостта от „обратна връзка“, а и защото самото познание е диалогично – то представлява своеобразен „диалог с природата“.

Маркирани са някои аналитични приложения, HLA типизация, генетично модифицирани организми, гено-географски анализ, биосензори на основа манипулирани клетки и други.

Включени са и редица други теми, станали класически в приложната биология.

Съдържанието на настоящото учебно пособие е представено непосредствено след предговора. Учебните програми на курсовете, за съжаление, не са публични в СУ „Св. Климент Охридски“, но съдържанието на пособието във висока степен съответства на учебната програма на курса. Една съществена особеност на структурата на учебната програма, е че курсът е изграден от три модула, всеки по 15 часа. В първия модул се анализира интегрално, от гледна точка на системната биология, приложният капацитет на съвременната биология - в частност, на молекулярната и клетъчната биология. Във втория модул се разглеждат последователно основни направления на разнообразните приложения на молекулярната и клетъчната биология. Третият модул представя избрани конкретни актуални приложения.

Както в цялостния курс, така и в учебното пособие към него, не са представени всички теми, които се обединяват в съвременната приложната молекулярна и клетъчна биология. Част от темите са развити неравнопоставено. Някои са маркирани твърде кратко. Основните причини за това са две – свързани с ограниченията и структурата на общата програма на бакалавърската степен по молекулярна биология. Настоящият курс е последен в четиригодишното обучение на студентите и, съответно, е спазвано правилото да няма съществени повторения на учебно съдържание. Курсът фактически се опитва да интегрира предходните знания на студентите, получени в хода на цялостното им обучение в бакалавърската степен. Това е една твърде амбициозна задача в рамките на 45 учебни часа лекции в последния семестър, и се налага повече или по-малко селективен подход.

Курсът се провежда по следния начин: Студентите имат ежеседмично тричасова лекция. Теми и проблеми, които са изучавали в предходни курсове, при необходимост да се припомнят, само се маркират, за да се интегрират в общия обем на конкретно разглежданата тема. От студентите не се очаква да водят записки, а да слушат и да участват в обсъждания. След приключване на лекционното аудиторно занятие в повечето от случаите се провежда тестови контрол, за да се провери какво са разбрали/усвоили. Всички студенти са включени в електронна платформа, в която те получават чрез личната си електронна поща материали от преподавателя и могат да контактуват с него индивидуализирано. Материалите, които студентите получават след всяка лекция са: лекцията, представена чрез презентация, оценките си от тестовия контрол, допълнителните помощни материали, част от които са предмет на настоящото учебно пособие, както и конкретни актуални статии по някои от дискутираните теми/проблеми. Чрез същата платформа преподавателят отговаря индивидуално на въпроси и прави общи коментари за всички участници в курса. В последната третина на семестъра се провеждат практическите занятия. Те се водят на цикъл по групи. Провеждат се в отлично оборудван лабораторен комплекс на територията на ИМБ-БАН, който покрива стандартите за добра лабораторна и добра производствена практика. Комплексът е съвместно изграден и поддържан от ИМБ и дружество, което практически функционира като научна организация от частен характер, специализирана в изследователска и внедрителска дейност.

В рамките на тази цялостна организация на курса е предвидено и функционира настоящото учебно пособие (помощни материали за студенти) по приложна молекулярна и клетъчна биология. То системно ще се променя и допълва, което заедно с изключително краткото време за подготовката му обяснява неговия сравнително „суров“ вид.

Отделните глави са последователно обвързани една с друга, но в същото време са относително независими. Информацията може да се групира в три базови направления: преглед на приложния капацитет на съвременната биология - в частност, на молекулярната и клетъчната биология, от гледна точка на системната биология; основни направления на разнообразните приложения на молекулярната и клетъчната биология и конкретни актуални приложения.

Учебното пособие подпомага подготовката, като дава общите основи и междупредметните връзки в съвременната приложна биология и паралелно с това осигурява възможността за бъдещо надграждане на получените знания в различни по насоченост магистърски програми и области на пряка професионална реализация на студентите.

V. Научни доклади и съобщения

1. И. Б. Минков, Е. Л. Грънчарова, С. Чакъров (1985). Участие на магнезиевите йони в промяната на активността на АТФ-азния комплекс на митохондриите. Резюмета от III национален конгрес по биохимия и биофизика, 19-25 май, Дружба, Варна, II. 2. 5.

Преинкубирането на АТФ-азния комплекс на митохондриите (субмитохондриални частици) или изолиран фактор P1 с ниски концентрации на АДФ (до 1 мкМ) води до инхибиране на началната скорост на АТФазната реакция в резултат на образуване на неактивен комплекс АТФ-аза.АДФ. Това инхибиране се осъществява само в присъствие на магнезиеви йони. Полумаксимално инхибиране на активността се регистрира при концентрации на магнезиевите йони (200 мкГ-йон), съществено по-високи от концентрацията на АДФ (1 мкМ). Следователно, магнезиевите йони са необходими не само за образуване на комплекса АДФ.Mg, но и непосредствено участват в модификацията на ензимната активност. Добавянето на азид в преинкубационната среда подтиска дисоциацията на неактивния комплекс АТФаза.АДФ. Едновременно с това интактните митохондрии катализират както хидролизата, така и синтеза на АТФ в отсъствие на екзогенно добавени йони. Добавянето на магнезиеви йони в реакционната среда не оказва влияние върху двете реакции (хидролизата и синтеза на АТФ), но съществено променя чувствителността спрямо инхибитора на АТФ-азния комплекс – азид. В присъствие на екзогенно добавени магнезиеви йони азидът не оказва влияние на фосфорилирането, но подтиска обратната реакция – хидролизата на АТФ. Инхибирането на АТФазната реакция от азид се осъществява само по време на реакцията (азидът не подтиска началната скорост) и зависи от концентрацията на екзогенно добавените магнезиеви йони. Представените резултати позволяват да се разглежда възможността за преход на АТФазата от форма, чувствителна спрямо азид във форма, нечувствителна към азид. Преходът от една форма в друга се осъществява с участието на АДФ и магнезиеви йони. Представените резултати са в съответствие с обсъжданата в литературата възможност АТФ-азният комплекс да съществува в две различни форми: форма, осъществяваща хидролизата на АТФ; и форма, осъществяваща синтеза на АТФ и дават информация за еднопосочното действие на азида върху активността на АТФазния (АТФ-синтетазния) комплекс.

2. S. Chakarov, St. Panayotov, N. Nikolaev (1990). A molecular probe specific for *Mycoplasma pneumoniae* prepared by polymerase chain reaction (PCR). Abstracts of the First International Young Scientists Conference “Problems and methods in molecular and cell biology”, 12-18 Sep, Kavarna, Bulgaria, p. 18-19.

С. Чакъров, Ст. Панайотов, Н. Николаев. Молекулна сонда, специфична за *Mycoplasma pneumoniae*, подготвена чрез полимеразна верижна реакция. Резюмета от Първата конференция на младите учени с международно участие „Проблеми и методи в молекулярната и клетъчната биология”, стр. 18-19, 12-18 септември 1990 г., Каварна.

Чрез анализ на данни за антигенната специфичност на антитела срещу антигени, представящи продукти от припокриващите се P1 клонове от *M. pneumoniae* беше подбран високоспецифичен ДНК фрагмент с дължина 140 bp. Бяха подготвени праймери за PCR и олигонуклеотидни сонди за фрагмента и беше изследвана тяхната специфичност. Фрагментът беше намножен чрез PCR, клониран в pUC18 и секвениран. Получената молекулна сонда беше изследвана за специфичност срещу хомоложна и хетероложна ДНК и беше проучена нейната приложимост в диагностичната практика. На тази основа беше направен дизайн на диагностичен кит, основан на PCR – технология.

3. S. Chakarov, P. Milev, N. Matova, N. Nikolaev (1990). Manipulating high molecular weight DNA by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Abstracts of the First International Young Scientists Conference "Problems and methods in molecular and cell biology". 12-18 Sep, Kavarna, Bulgaria, p. 39.

С. Чакъров, П. Милев, Н. Матова, Н. Николаев. Манипулиране на високомолекулярна ДНК чрез електрофореза в пулсиращо поле (PFGE). Резюме от Първата конференция на младите учени с международно участие „Проблеми и методи в молекулярната и клетъчната биология”, стр. 39, 12-18 септември 1990 г., Каварна.

От различни източници – човешки клетъчни линии, дрожди, *Chlamydomonas* spp., и ламбда фаг-олигомери беше изолирана високомолекулярна ДНК, която беше смесена с агароза и излята на блокчета и подложена на електрофоретичен анализ. Бяха наблюдавани фрагменти с дължина между 40 kВ и 10 mВ, между които олигомерни стълбци от ламбда фагова ДНК; рестрикционни профили на човешка ДНК, обработена с рядко режещи рестрикционни ендонуклеази и цели интактни хромозоми на *Saccharomyces cerevisiae* и *Chlamydomonas reinhardtii*. Беше подбрана оптималната техника за пренос на ДНК от гелове, раздвижвани в пулсово поле върху мембрана и ефективността на преноса беше мониторирана в условия на self-хибридизация.

4. A. Ivanova, A. Alexandrov, L. Chakalova, Zl. Kalvachov, O. Georgiev, St. Chakarov, N. Nikolaev (1991). DNA probes for diagnostics of Hepatitis B virus. Abstracts of the Second International Young Scientists Conference "Problems and methods in molecular and cell biology" 1-8 Sep, Kavarna, Bulgaria, p. 11.

А. Иванова, А. Александров, Л. Чакалова, Зл. Кълвачов, О. Георгиев, Ст. Чакъров, Н. Николаев (1991). ДНК сонди за диагностика на Хепатит В вирус. Резюме от Втората конференция на младите учени с международно участие „Проблеми и методи в молекулярната и клетъчната биология”, стр. 11, 1-8 септември 1991 г., Каварна.

Гените, кодиращи Нbс антигена и коровия антиген бяха клонирани в pUC18. След белязване с [³²P] или нерадиоактивно белязване, фрагментите бяха използвани като молекулярни сонди. Бяха изследвани серуми от пациенти със заболяване в различен стадий и от Националната кръвна банка. Резултатите бяха сравнени с резултатите от имунохимичния анализ на същите проби.

5. M. Dineva, A. Ivanov, E. Bratovanova, St. Chakarov, N. Nikolaev, D. Petkov (1991). Synthesis of oligonucleotide with methylphosphonate bonds and reverse transcription experiments with methylphosphonate bonds and reverse transcription. Abstracts of the Second International Young Scientists Conference "Problems and methods in molecular and cell biology" 1-8 Sep, Kavarna, Bulgaria, p. 16.

М. Динева, А. Иванов, Е. Братованова, Ст. Чакъров, Н. Николаев, Д. Петков (1991). Синтез на олигонуклеотиди с метилфосфонатни връзки и експерименти по обратна транскрипция с метилфосфонатни праймери. Резюме от Втората конференция на младите учени с международно участие „Проблеми и методи в молекулярната и клетъчната биология”, стр. 16, 1-8 септември 1991 г., Каварна.

По методологията на Engels et al. бяха синтезирани метилфосфор-амидитни синтони. Продуктите бяха използвани за автоматичен твърдофазен синтез в синтезатор MilliGen 7500. Данните от тритиловата колориметрия и електрофоретичният анализ на неспецифичните хидролизни продукти показа успешен синтез на последователността 3'-ГрСрТрТрТрТрТрТрТрТ-5'(p-фосфодиестер, p-метилсулфонат). Пречис-теният олигонуклеотид беше изпробван като праймер за обратна транскриптаза с използване на глобинова поли-А-мРНК (Amersham) и тотална поли-А- мРНК от нервна тъкан на

плъх като матрици. Резултатите показаха успешен синтез на ДНК верига. Обсъждат се моделни *in vivo* експерименти по *in situ* синтез на антисенс-ДНК.

6. П. Стоилов, К. Граматиков, С. Чакъров, О. Георгиев. Промени в белтъчната синтеза на *E. coli*, предизвикани от насочена мутагенеза на 16S РНК. Резюмета от V научна сесия на Биологическия факултет, стр. 41/42, 20-21 май 1993 г., София.

В плазмидната конструкция pNO 2680 (Dahlberg) беше проведена насочена мутагенеза в гена за 16S РНК, като беше лигирана инсерция от 50 н. дв. в места 1441 и 1504. Така модифицираният *rrnB* оперон беше интегриран в *E. coli* чрез плазмид и се транскрибираше под контрола на ламбда P_L промотор. Преживяемостта на транскрипта беше проследена чрез хибридизационен анализ. Повлияването на тоталната белтъчна синтеза беше проследено чрез двумерна полиакриламидна електрофореза (изофокусиране / SDS-гел). Дискутирана е индукцията на молекулни шаперони, свързани с рибозомните субединици и на белтъци, свързани с деградацията на рибозомните РНК.

7. Г. Генова, Ст. Чакъров, Е. Атанасова. Соматична амплификация на рибозомните гени в условия на магнификация при *Drosophila melanogaster*. Резюмета от V научна сесия на Биологическия факултет, стр. 85/86р 20-21 май 1993 г., София.

У *Drosophila melanogaster* магнификацията като процес на наследствено увеличаване на броя на рибозомните гени се извършва в половата тъкан на мутанти с фенотип *bobbed*. В настоящото изследване е показано увеличение на този брой и в соматичната тъкан – соматична амплификация на рибозомните гени, визуализирана цитологично чрез появата на множествени ядърца. В присъствие на мейотичната мутация *mei 9^a* соматичната амплификация е подтисната. Наблюдаваните процеси корелират със събитията в половата тъкан на магнифицираните индивиди, където се извършва умерена реверсия на мутантния фенотип до нов тип в отсъствие в генотипа на *mei 9^a*. Чрез хибридизация *in situ* на нерадиоактивно белязани молекулни маркери на рибозомните гени *ins⁺*, *insI* и *insII* с рДНК от клетките на слюнните жлези установена неселективна амплификация на тези типове рибозомни повтори в условия на магнификация.

8. Б. Маринчева, Л. Чакалова, Ст. Чакъров, А. Ангелова. Един възможен подход за търсене на сходство в отговора на стресови въздействия при растения. Резюмета от V научна сесия на Биологическия факултет, стр. 105/106, 20-21 май 1993 г., София.

Настоящата работа представлява опит да се потърси сходство в отговора на различни видове стресови въздействия при растения, като се приложи имунологичен подход. Като изходна постановка е използван студов стрес с презумпцията за силно доминиране на стресовите белтъци в ранните етапи на въздействие, съчетано със забавянето на физиологичните процеси (метаболитната активност) при ниските температури. Чрез пулсово белязане с (¹⁴C)- аминокиселинна смес в коренчета от 6-дневни покълнеци на пшеница (*Triticum aestivum* L., сорт „Садово 1”) е установен маркер-белтък със силно повишена синтеза при кратки студови въздействия (0-6°C). Чрез полиакриламидна електрофореза в присъствие на SDS и двумерна белтъчна електрофореза с последваща флуорография са определени молекулната му маса и изоелектричен пункт. Срещу тотален белтъчен екстракт от корени на така третираната пшеница е получен поликлонален серум в заек. Той е обогатен афинитетно срещу потенциалните стресови белтъци. С изработените антитела е проведен имуохимичен скрининг на белтъчните профили от пшеница, подложена на студов, соли и

температурен шок. Въз основа на получените специфични имунологични профили се дискутира възможността чрез този подход да се търси единство в отговора на стресови въздействия при растения.

9. П. Василев, Б. Маринчева, П. Стоилов, **Ст. Чакъров** (1993). Нов амфолит в двумерната полиакриламидна електрофореза. Резюмета на XI национален симпозиум „Полимери 1993”, стр. 145/ П 5.6., 7-9 октомври, „Св. Константин и Елена” - Варна.

Съполимерът на акриламида и N,N-метиленбисакриламида се използва широко при разделянето на биологични макромолекули. Фракционирането на белтъци в полиакриламиден гел може да се реализира в условията на рН градиент, образуван от носещи амфолити. В настоящото изследване се прави опит за прилагане на нов амфолит – Alkalyte на фирмата Reanal (Унгария) за разделяне на алкални белтъци с висок сумарен заряд, изолирани от телешки тимус, както и на белтъчни екстракти от растителни и бактериални клетки чрез неравновесна полиакриламидна електрофореза в градиент на рН. Получените белтъчни профили се анализират чрез провеждане на електрофореза във второ направление в присъствието на натриев додецилсулфат в съпоставка с известните амфолити на фирмите Serva и LKB-Pharmacia. Резултатите показват, че полиакриламидният гел, получен с новия продукт Alkalyte има достатъчна здравина и стабилност и показва идентични белтъчни профили с рутинно прилаганите амфолити Servalyte и Pharmalyte при стандартни условия. По-широкият обхват на рН на новия амфолит (3-13.5) разкрива по-добри възможности за анализ на алкални белтъци с висок сумарен заряд.

10. А. Angelova, **St. Chakarov**, L. Chakalova, P. Vassilev, M. Stambolova (1993). High mobility group nonhistone proteins in developing rat brain cells and in cultivated glial cells. Proceedings of the 13th European Workshop on Cell Nucleus, 21-25 June, Balatonaliga, Hungary, p. 8.

А. Ангелова, **Ст. Чакъров**, Л. Чакалова, П. Василев, М. Стамболова. High mobility group nonhistone proteins in developing rat brain cells and in cultivated glial cells. Резюмета от тринадесетата европейска работна среща, посветена на клетъчното ядро, стр. 8, 21-25 юни 1993 г., Балатоналига, Унгария.

Бяха изолирани бързоподвижни нехистонови белтъци и беше проследено присъствието на белтъците от група I/Y в мозъчни клетки на плъхове на различна възраст след раждането с използване на SDS и киселина/урея полиакриламидна гел-електрофореза. Присъствието на съответните транскрипти беше проследявано чрез хибридизационен анализ по Northern със специфични фрагменти от човешка кДНК като молекулни сонди. Обсъжда се корелацията между наблюдаваните промени и постнаталното развитие на плъши нервни клетки.

11. А. Angelova, **St. Chakarov**, L. Chakalova, A. Velichkova, M. Stambolova (1994). Studies on HMGI/Y proteins in developing rat brain cells and in cultured glial cells. Abstracts of the 10th Balkan Biochemical and Biophysical Days, 22-25 May, St. Konstantin, Varna, p. 117/C7.

А. Ангелова, **Ст. Чакъров**, Л. Чакалова, А. Величкова, М. Стамболова (1994). Изследвания върху HMGI/Y белтъците в клетки от развиващ се мозък на плъх и в култивирани глиални клетки. Резюмета на Десети балкански биохимични и биофизични дни, стр. 117/C7, 22-25 май 1994 г., „Св. Константин и Елена” - Варна.

Беше изследвана динамиката на HMGI/Y белтъците през време на диференциацията и пролиферацията на клетки от развиващ се плъши мозък и култивирани глиални клетки. Култивираните клетки бяха третирани с опиоидни или

митогенни пептиди. При синтезата на ДНК се инкорпорираше ³H-тимидин. Количеството на специфичните транскрипционни фактори беше оценявано чрез EMSA. С цел повишаване на чувствителността на детекцията, белтъците бяха белязани с ³²P-о-Н₃PO₄. Количественият анализ на белтъците беше извършен чрез киселина/урея полиакриламидна гел-електрофореза и флуорография. Нивото на съответните мРНК беше оценено чрез хибридизационен анализ. При възрастните животни беше наблюдавано намалено количество HMGI/Y белтъци. Митогенните пептиди и инхибиторите на пролиферативната активност предизвикваха детектируеми промени в обратна посока на нивото на HMGI/Y белтъците. Обсъжда се корелацията между нивото на HMGI/Y белтъците и пролиферативната активност на мозъчните клетки.

12. A. Alexandrov, E. Karaulanov, **St. Chakarov** (1994). Effect of the pulse time on cccDNA migration in PFGE. Abstracts of the 10th Balkan Biochemical and Biophysical Days, 22-25 May, St. Konstantin, Varna, p. 361/I5.

А. Александров, Е. Карауланов, **Ст. Чакъров** (1994). Влияние на пулсовото време върху миграцията на ковалентно затворена кръгова (ccc) ДНК при PFGE. Резюмета на Десети балкански биохимични и биофизични дни, стр. 361/I5, 22-25 май 1994 г., „Св. Константин и Елена” - Варна.

Изследвахме електрофоретичната подвижност на няколко плаزمиди, получени от различни организми и с различна дължина на веригата в условия на различна пулсова дължина в буферна система TAFE. Паралелно бяха проведени проучвания с пречистени конкатемерни форми на 6 kV плазмид в условия на двумерна електрофореза (конвенционална/TAFE) и 196 kV Ti плазмид от *Agrobacterium tumefaciens*. Миграцията на ДНК на pTi в условия на PFGE беше изследвана чрез хибридизационен анализ по Southern. Получените резултати се обсъждат от гледна точка на влиянието на топологията на молекулата върху интимните механизми на миграцията на cccДНК в условия на PFGE.

13. St. Kirov, A. Alexandrov, P. Stoilov, D. Demirov, **S. Chakarov** (1994). Mutagenesis of a fragment from the *Mycoplasma pneumoniae* P1 adhesine gene. Abstracts of the 10th Balkan Biochemical and Biophysical Days, 22-25 May, St. Konstantin, Varna, p. 374/I8.

Ст. Киров, А. Александров, П. Стоилов, Д. Демиров, **С. Чакъров** (1994). Мутагенеза на фрагмент от гена за адхезин P1 на *Mycoplasma pneumoniae*. Резюмета на Десети балкански биохимични и биофизични дни, стр. 374/I8, 22-25 май 1994 г., „Св. Константин и Елена” - Варна.

Генният продукт P1 на *Mycoplasma pneumoniae* е отговорен за адхезията на микроорганизма върху повърхността на белодробните клетки. Беше клониран получен чрез PCR фрагмент от P1 гена на *Mycoplasma pneumoniae*, чиято секвенция кодира антигенната детерминанта на P1 адхезина. Беше проведена PCR-мутагенеза. Чрез използване на секвенционен анализ бяха подбрани подходящи клонове и бяха подготвени съответните експресионни конструкти. Предстои да бъде извършен анализ на тези конструкти.

14. A. Alexandrov, **St. Chakarov**, G. Russev (1995). The effect of pulse time on cccDNA migration in PFGE. Abstracts of the IV Meeting of the Program in Mathematical and Molecular Biology (PMMB). 11-15 Nov, Santa Fe, New Mexico, USA.

А. Александров, **Ст. Чакъров**, Г. Русев (1995). Ефектът на пулсовото време върху миграцията на ковалентно затворена кръгова (ccc) ДНК при PFGE. Abstracts of the IV Meeting of the Program in Mathematical and Molecular Biology (PMMB). 11-15 Nov, Santa Fe, New Mexico, USA.

15. √ G. Russev, **St. Chakarov**, P. Stoilov, A. Alexandrov (1996). Repair pattern in the β -globin gene cluster of human fibroblasts after UV irradiation. Abstracts of the IMP Spring Conference, May 1996, Vienna, Austria, p. 108. Abstract published in: Chromosome Research Volume 4, Number 2 (1996), 168, DOI: 10.1007/BF02259713

√ Г. Русев, **Ст. Чакъров**, П. Стоилов, А. Александров (1996). ДНК поправка в бета-глобиновия генен кластер при човешки фибробласти след облъчване с UV. Abstracts of the IMP Spring Conference, May 1996, Vienna, Austria, p. 108. Abstract published in: Chromosome Research Volume 4, Number 2 (1996), 168, DOI: 10.1007/BF02259713

16. √ G. Russev, P. Stoilov, L. Chakalova, **St. Chakarov** (1997). Comparison of repair activity in different genomic regions. Abstracts of the Conference on Mechanism of DNA Repair And Mutagenesis in Honor of the 100th Anniversary of the Discovery of Polonium and Radium, 8-11 Oct, Warsaw, p. 33.

√ Г. Русев, П. Стоилов, Л. Чакалова, **Ст. Чакъров**. Сравнение на репарационната активност в различни геномни региони. Резюмета на Конференцията по механизми на поправката на ДНК и мутагенезата в чест на стотната годишнина от откриването на полония и радия, стр. 33, 8-11 октомври 1997 г., Варшава, Полша.

Ние разработихме метод за количествена оценка на поправката на структурно различни увреждания в ДНК в дефинирани геномни региони. Методологията е основана на това, че много различни типове увреждания се поправят от един и същи механизъм за поправка с изрязване на нуклеотиди, включвайки синтез на къси ДНК фрагменти на местата на увреждането. След излагане на действието на увреждащ агент, клетките бяха третирани с 5-бромдеоксиуридин (BrdUrd) за белязване на участъците, които се поправят с презумпцията, че участъците, които се поправят по-ефективно ще инкорпорират по-голямо количество BrdUrd от участъците, които се поправят с по-малка ефективност. Така относителното количество на различните последователности съдържащи BrdUrd би могло да се използва като директна количествена мярка за ефективността на поправката в съответните региони. Относителният дял на различните ДНК последователности беше определяно или имунохимично, или чрез количествен PCR, използвайки BrdUrd-съдържащата ДНК фракция като матрица. Във втория случай количеството на продукта беше правопрпорционално на концентрацията на матрицата. Описаният подход беше използван с цел да се изясни въпросът дали поправката на ДНК след UV облъчване се извършва равномерно във всички геномни региони, или някои региони се поправят преференциално пред други. Наблюдавахме по-висока ефективност на поправката на ДНК в 5'-края на бета-глобиновия ген както в миши, така и в човешки клетки.

17. A. Angelova, **St. Chakarov**, Z. Tencheva, F. Avramova, V. Simeonova (1997). RNA polymerase activity in isolated rat brain nuclei in the presence of HMGI/Y and anti-HMGI/Y antibodies. Abstracts of the 11th BBB Days, Thessaloniki, Greece, 15-17 May, p. 43, 80.

А. Ангелова, **Ст. Чакърров**, Ц. Тенчева, Ф. Аврамова, В. Симеонова. РНК полимеразната активност в ядра от мозък на плъх в присъствие на HMGI/Y белтъци и анти-HMGI/Y антитела. Резюмета на Единадесети балкански биохимични и биофизични дни, стр. 43, 80, 15-17 май 1997 г., Тесалоники, Гърция.

Беше изследвана РНК полимеразната активност в изолирани ядра от мозък на плъх в присъствие на екзогенни HMGI/Y белтъци и анти-HMGI/Y антитела. Беше проследена тоталната инкорпорация на [³H]-УТР в неразтворим в трихлороцетна киселина продукт, както и активността на ензимната фракция, чувствителна към α -аманитин. Ядрата бяха пермеабилizирани чрез кратка обработка с детергент. Естествени HMGI/Y белтъци бяха изолирани чрез екстракция с оцетна киселина след разделяне в препаративни полиакриламидни гелове. Рекомбинантен човешки HMGI/Y беше клониран в *E. coli* BL21 и пречистен чрез Ni²⁺ металохелатна афинитетна хроматография (Qiagen). Анти-HMGI/Y антитела бяха създадени в зайци и бяха пречистени с помощта на Affi Gel Blue Gel (BioRad). Беше наблюдавано снижение на тоталната и чувствителната на α -аманитин ензимни активности след добавяне на антителата. Прясно получен екзогенен HMGI/Y белтък причиняваше покачване на активностите и възстановяваше нивата на инкорпорация. Може да се заключи, че HMGI/Y белтъците участват в *in vitro* РНК синтезата в използваната система, като е важно те да бъдат в несвързана форма.

18. K. R. Christova, S. A. Kirov, **St. A. Chacarov** (1997). Application of AP-PCR fingerprinting to the taxonomic studies of Streptomyces. Abstracts of the 11th BBB Days, Thessaloniki, Greece, 15-17 May, p. 97, 284.

К. Р. Христова, С. А. Киров, **Ст. А. Чакърров**. Приложение на AP-PCR фингърпринтинг за изследвания на таксономията на Streptomyces. Резюмета на Единадесети балкански биохимични и биофизични дни, стр. 97, 284, 15-17 май 1997 г., Тесалоники, Гърция.

Таксономията на Streptomyces се базира на числени техники, но за идентификация и охарактеризиране на щамове Streptomyces съществуват и молекулярно-биологични подходи. Фингърпринтингът чрез Arbitrarily Primed (AP)-PCR намира приложение за типизация на бактериални щамове и видове. Използвахме 15 щам, принадлежащи към четирите отграничени по критериите на Williams вида *S. albus*, *S. albidoflavus*, *S. fradiae* и *S. griseus* с цел разработване на AP-PCR метод, приложим при стрептомицети. Бяха изпробвани двадесет и един PCR праймера за получаване на полиморфни геномни фингърпринти. С използване на дванадесет праймера с дължина 10 нуклеотида се получиха ивици, детектируеми в оцветени с етидиев бромид гелове. Четири от тях (заедно с един праймер с дължина 21 нуклеотида) бяха избрани да бъдат използвани със всички щамове, тъй като даваха възпроизводими и информативни резултати. Бяха оптимизирани параметрите, влияещи на възпроизводимостта на описвания метод: концентрации на магнезиевите йони, на праймерите и на матрицата. Беше проведен кластерен анализ. Чрез AP-PCR фингърпринтинг щамовете, попадащи в четирите дефинирани от Williams четири вида (*S. albus*, *S. albidoflavus*, *S. fradiae* и *S. griseus*) бяха подразделени на кластери.

19. А. Ангелова, Ст. Чакъров, Ц. Тенчева. Възможни механизми за действие на бързоподвижните нехистонови хромозомни белтъци от семейството на БПБ 1/2 и БПБ I/Y при регулация на генната експресия в еукариотните клетки. Резюмета на VII научна сесия на Биологическия факултет, стр. 161, 29-30 май 1997 г., София.

Разпознаването между белтъци и нуклеинови киселини е един от ключовите моменти в избирателната експресия на еукариотните гени. Регулаторните последователности в ДНК и регулаторните молекули, които взаимодействат специфично с тях са обект на интензивни изследвания. Още най-ранните данни за нехистоновите белтъци предполагат ролята им на специфични регулатори на транскрипцията. Едни от най-интересните и засега все още неизяснени въпроси са свързани с молекулните механизми на тяхното действие. Изследват се възможностите от прякото разпознаване между индивидуални белтъци и нуклеинови киселини до образуването на хетерогенни многомолекулни комплекси, при които спецификата се определя от алтернативни комбинации между отделните компоненти. Разглеждат се две семейства на бързоподвижните нехистонови белтъци – БПБ 1/2 и БПБ I/Y. Обобщават се основните данни за наличието и динамиката на тези белтъци в различни видове клетки и спецификата на взаимодействията им с ДНК. Съобщават се най-новите сведения за свойството на БПБ 1/2 да разпознават Х-образна пространствена структура, образувана от кръстосването на два участъка от двойноверижна ДНК. Така тяхната роля се свързва с участие в един по-широк спектър от биологични процеси. Обсъждат се възможностите на БПБ I/Y да действат като коактиватори на транскрипцията, които чрез взаимодействията си с транскрипционни фактори и специфични ДНК последователности подпомагат образуването на инициационния комплекс. Отделя се специално внимание на специфичните методи на молекулярната и клетъчна биология, които са използвани при тези изследвания.

20. А. Ангелова, Ст. Чакъров, Ц. Тенчева, Ф. Аврамова, В. Симеонова. Влияние на бързоподвижните хромозомни белтъци БПБ I/Y върху РНК полимеразната активност в изолирани ядра от мозъчни клетки на плъх. Резюмета на VII научна сесия на Биологическия факултет, стр. 211, 29-30 май 1997 г., София.

Изследвано е влиянието на екзогенен БПБ I/Y върху РНК полимеразната активност в изолирани ядра от мозъчни клетки на плъх. Ядрата са пермеабилитизирани чрез краткотрайна обработка с детергент. Използван е естествен БПБ I/Y, получен чрез екстракция с оцетна киселина от препаративни полиакриламидни гелове или рекомбинантен човешки белтък, клониран в *E. coli* BL21 и пречистен чрез никелова металохелатна афинитетна хроматография (Qiagen). Проследена е общата активност на включване на белязан уридинтрифосфат в ТХО-нератворим продукт, както и активността на чувствителната към α -аманитин ензимна фракция. Получените резултати дават основание да се приеме, че БПБ I/Y е необходим компонент при синтезата на РНК в използваната *in vitro* система. Съдържа се в достатъчно високо количество, което осигурява синтезата на РНК при условията на реакцията.

21. Р. Пенчовски, С. Чакъров, Г. Генова. Туморната супресорна мутация 1/2/gd увеличава нивото на експресия на протоонкогена *dJra* в *Drosophila melanogaster*. Резюмета на VII научна сесия на Биологическия факултет, стр. 251, 29-30 май 1997 г., София.

С настоящото изследване е показано, че у *Drosophila melanogaster* с туморен фенотип, определен от туморната супресорна мутация 1/2/gd, която е използвана като моделна система за формиране на тумори е повишено нивото на експресия на *dJra*. Въз

основа на тези и на литературни данни може да се предполага автономно действие на протонкогените *dfra* и *djra* в туморогенезата при *Drosophila*.

22. Р. Петкова, А. Савов, Ст. Чакъров, И. Кременски. Идентификация на нови алели в късите тандемно повторени последователности на гена за фактор VIII при български пациенти с хемофилия А. IX Научна Сесия на Биологическия факултет при Софийския Университет, стр. 186-187, 29–30 ноември 2001 г.

Хемофилия А е разстройство на кръвосъсирването, причинено от дефекти в гена за фактор VIII, кодиращ кофактор, участващ в коагулационната каскада. Молекулярно-биологичните изследвания с цел установяване на статус на носителство и пренатална диагностика са от голяма полза при преобладаващата част от семействата с фамилна история, обременена от хемофилия А. Високоинформативните къси тандемни повтори, разположени в интроните на гена за фактор VIII са особено подходящи за откриване на родственици на болните, от женски пол и с висок риск от раждане на болно от хемофилия А дете, с цел да се предотврати повторна поява на болестта в семейството. Настоящото изследване обхваща 133 пациенти и членове на семейства, засегнати от хемофилия А. Пациентите и техните родственици са изследвани по често използвани маркери – динуклеотидни повтори. Освен известните алели на тези маркери бяха открити и нови алели, които са с по-голяма дължина от описаните в литературата. Наблюдаваната от нас повишена хетерогенност в локусите на късите тандемни повтори в гена за фактор VIII повишава информативността на тези маркери при използването им в българската популация.

23. Р. Петкова, Ст. Чакъров, А. Хорват, В. Ганев, И. Калев, И. Кременски. Изследване върху честотата на фактор V Leiden при болни от хемофилия А в българската популация и генотип – фенотипни корелации. IX Научна Сесия на Биологическия факултет при Софийския Университет, стр. 188-189, 29–30 ноември 2001 г.

В последно време възникна предположението, че клиничните прояви на тежките форми на хемофилия А се повлияват от едновременно унаследяване на молекулни дефекти, които сами по себе си са рискови фактори за поява на венозни тромбози. Към групата на тези дефекти спада мутацията Фактор V Leiden, която представлява транзиция на G към A на 1691 позиция в гена за Фактор V. Изследвани бяха 30 пациенти с хемофилия А, което е представителна извадка от популацията на болните от хемофилия А в България. При един пациент (3.23 %) беше намерена мутацията Фактор V Leiden в хетерозиготно състояние. Така намерената честота е значително по-ниска от наблюдаваната в други популационни проучвания. Тъй като единия идентифициран пациент с хемофилия с мутация Фактор V Leiden не е наблюдавано по-леко протичане на основното заболяване, ние смятаме, че тази част от болните, при които се наблюдава облекчаване на клиничното протичане на разстройството на кръвосъсирването поради сънаследяване на мутацията Фактор V Leiden е относително малка. Друго предположение за обяснение на получените данни е наличие на отрицателна селекция по отношение на ембрионите от мъжки пол, носещи повече от един дефект в гените за фактори на кръвосъсирването.

24. Р. Петкова, А. Хорват, **Ст. Чакъров**, И. Калев, И. Кременски. Хемофилия А в българската популация и генотип-фенотипни корелации. VII Национален Конгрес по Клинична Лаборатория, А38, 7-8 юни 2002, НДК, София.

Наскоро възникна предположението, че клиничните прояви на тежките форми на хемофилия А се повлияват от едновременното унаследяване на фактори, които сами по себе си са рискови за поява на дълбоки венозни тромбози. Към групата на най-често срещаните протромботични молекулни дефекти спада мутацията Фактор V Leiden, която представлява замяна на G с A на 1691 позиция в десети екзон на гена за Фактор V. Изследвани бяха 30 пациенти с хемофилия А, което е представителна извадка от популацията на болните от хемофилия А в България. При един пациент (3.23 %) беше намерена мутацията Фактор V Leiden в хетерозиготно състояние. Така намерената честота е по-ниска от наблюдаваната в други популационни проучвания. Тъй като при болния от хемофилия с мутация Фактор V Leiden не се наблюдава по-леко протичане на основното заболяване, ние смятаме, че тази част от болните, при които се наблюдава облекчаване на клиничното протичане на разстройството на кръвосъсирването поради съунаследяване на мутацията Фактор V Leiden е относително малка. Друго предположение за обяснение на получените данни е наличие на отрицателна селекция по отношение на мъжките индивиди, носещи повече от един дефект в гените за фактори на кръвосъсирването.

25. С. Иванова, Р. Петкова, И. Кременски, **С. Чакъров**. Бърз и ефективен метод за диагностика на най-често срещаните мутации, причиняващи тежка форма на хемофилия А чрез RT-PCR в илегалитимни транскрипти на фактор VIII. X Юбилейна Научна Сесия на Биологическия факултет при Софийския Университет, 29 –31 ноември 2003, р. 124.

Една и съща мутация в гена за фактор VIII на кръвосъсирването причинява около 50 % от случаите на тежка хемофилия А (около 25 % от всички). Мутацията представлява инверсия, възникваща вследствие на интрахромозомна хомоложна рекомбинация. В резултат на инверсията, голяма част от гена (екзони 1-22) се измества на голямо разстояние от останалата част (екзони 23-26) и се обръща в обратна посока спрямо посоката на транскрипция на гена. Това е възможно поради наличието на участъци с висока степен на хомология помежду си, намиращи се в интрон 22 и извън гена. Извънгенните участъци, които служат като точки на разкъсване на инверсията се намират на разстояние 300 и 400 kВ геномна ДНК, съответно, и посоката им на транскрипция е обратна на посоката на транскрипция на гена за фактор VIII. Ние предлагаме алтернативен метод за детекция на инверсията, който може евентуално да намери приложение в диагностиката за определяне на носителство и пренаталната диагностика. Методологията е основана на анализ на физическата връзка между екзон 22 и екзон 23 на гена за Фактор VIII. Експерименталният принцип включва «гнездови» PCR, проведен върху илегалитимни транскрипти на гена за фактор VIII в лимфоцити. Извършва се, от една страна, амплификация през границите на екзон 20 до 24 и, от друга страна, контролна амплификация на участъка от екзон 18 до екзон 22. Присъствието на продукт, съдържащ пълната дължина на фрагмента, включващ екзони 20 до 24 и на продукт от контролната амплификация показва, че генът за фактор VIII в изследвания индивид е интактен, докато липсата на продукт от региона на екзони 20-24 в присъствие на контролната ивица свидетелства за наличие на инверсия в гена.

26. Nikolova I; Petkova R; Atanassov B; **Chakarov S**, Galabov AS. Molecular genetic study of the disoxaril mutants of Coxsackievirus B1. 19th International Conference on Antiviral Research Location: San Juan, PR Date: MAY 07-11, 2006.

Николова И; Петкова Р; Атанасов Б; **Чакърров С**, Гълъбов АС. Молекулярно-генетично проучване на дизоксарилови мутантни щамове на Коксакивирус В1. Деветнадесета международна конференция за изследователската дейност, свързана с развитие на антивирусни препарати. Сан Хуан, Пуерто Рико, 07-11 май 2006 г.

Това съобщение от конгрес е включено в supplement на списанието Antiviral Research 2006, 70(1), стр. А77-А77. Списанието има 5-додившен импакт индекс 4.185. Публикацията има едно последващо независимо цитиране в: Mustaffa M, Zhelev N. You cannot always WIN: molecular bases of the resistance of picornaviruses to WIN compounds. Biotechnol Biotechnol Equip, 2012, 26(2), 2826-2828.

Беше извършен анализ на РНК последователността на резистентните към дизоксарил мутантни варианти на Коксакивирус В1. В настоящото изследване бяха включени чувствителният към дизоксарил щам от див тип (Connecticut 5); и два резистентни към дизоксарил мутантни щамове (единият получен във FL клетки, а другият изолиран от мозъци на новородени мишлета, инфектирани с Коксакивирус В1 и третирани с дизоксарил), както и зависим от дизоксарил мутантен щам, получен от резистентен щам чрез деветкратно пасажирание в клетъчна култура. Беше проведен RT-PCR с използване на двойки праймери, подбрани от участък на генома на Коксакивирус В1, кодиращ гена за капсидния белтък VP1. Беше проведен паралелен сравнителен анализ с помощта на аналитичния инструмент BLAST на последователностите на получените фрагменти от изследваните дизоксарилови мутанти и оригиналната референтна GenBank последователност на Коксакивирус В1. Бяха установени явни изменения във VP1 локуса на дизоксарил-резистентните и дизоксарил-зависимия мутантен щам в сравнение с референтната последователност от GenBank. По-точно, беше намерена делеция на UUG на позиции nt. 2749-2751 и инсерция на UUU на позиция nt. 2769. Беше намерена висока степен на подобие (97 %) между резистентния мутантен щам, получен в клетъчни култури и дизоксарил-зависимия щам, докато подобие то към „дивия тип“ щам беше само 91 %. Установено беше, че резистентният мутантен щам, получен в мишки, е в голяма степен подобен на щамове, получени в клетъчни култури. Изготвен е 3-D модел на пространственото нагъване на изследвания белтък в дизоксариловите мутантни щамове.

27. Angel S. Galabov, Ivanka Nikolova, Roumena Petkova, **Stoyan Chakarov** and Boris Atanasov (2006). Structural Basis For Antiviral Drug Resistance Of a VP1-mutated Enterovirus. 11th Congress of Bulgarian Microbiologists, St. Constantine, Varna, October 05-07, 2006, p. 63-64

Ангел С. Гълъбов, Иванка Николова, Румена Петкова, **Стоян Чакърров** и Борис Атанасов. Структурни основи на резистентността на ентеровирус с мутации в гена за белтъка VP1 към антивирусни препарати. Единадесети конгрес на българските микробиолози, стр. 63-64, „Свети Константин и Елена“, Варна, 05-07 октомври, 2006.

Преди около двадесет години беше установено, че антивирусните препарати от типа на WIN-компонентите (сред които са, например, арилдонът, плеконарилът, дизоксарилът и пр.) инхибират процеса на «разсъбличане» на вирусната нуклеинова киселина. Чрез рентгенова кристалография на вирус-инхибиторните комплекси беше показано, че основната мишена за антивирусното им действие е белтъкът VP1 от обвивката на вируса и по-точно, че инхибитори, намиращи се в хидрофобния джоб увеличават ригидността на структурата на VP1 и по този начин предотвратяват «разсъбличането» на вируса. Както може да се очаква, с в условия на естествен отбор

всички WIN-третиранни вируси от див тип се блокират и оцелява само резистентното на инхибитори от този тип поколение. Чрез използване на селекционен подход от вирусен щам от див тип, чувствителен към дизоксарил (Connecticut 5) бяха получени два резистентни на дизоксарил мутантни щамове на Коксакивирус В1. Единият щам резистентни вируси беше получен във FL клетки, а другият беше изолиран от мозъци на новородени мишлета, инфектирани с Коксакивирус В1 и третиранни с дизоксарил. Тези два щамове бяха използвани в по-нататъшните молекулярно-биологични изследвания. Беше извършен анализ на РНК последователността на вируса чрез RT-PCR с праймери, подбрани от регион в генома на Коксакивирус В1, кодиращ капсидния белтък VP1. Беше извършен сравнителен анализ на секвенциите на получените фрагменти от получените от нас дизоксарилови мутантни щамове и референтната секвенция на VP1 гена на Коксакивирус В1, депозирана в GenBank с помощта на аналитичния биоинформатичен инструмент BLAST. Бяха намерени различия с потенциално важно значение в секвенцията на VP1 локуса между референтната последователност и мутантните последователности, а именно делеция на UUG на позиции nt. 2749-2751 и инсерция на UUU на позиция nt. 2769. Беше установено, че резистентният мутантен щам, получен в мишки е в голяма степен подобен на щамове, получени в клетъчни култури. Като критично важни бяха преценени две точкови мутации, водещи до две аминокиселинни замени – M213N и F237L, и двете попадащи в лиганд-свързващия джоб. В региона 195-255 аминокиселинен остатък изследваните секвенции се различаваха много от референтната. Беше създаден 3D-модел на предполагаемата структура на VP1 белтъка на Коксакивирус В1 – див тип (вариант София) и на двата резистентни към дизоксарил мутантни щамове, използвайки като матрица предходно известната кристалографска структура на Коксакивирус В3 и с помощта на програмните пакети Composer-4 и MOLIDE. Използвайки програмния продукт за визуализация на молекулярна динамика GROMOS-96, в молекулната структура на VP1 белтъка на Коксакивирус В3 в условия на много ниска степен на свобода палмитиловият остатък беше заменен с дизоксарил. Генерираните структури на тетрамерни белтъци на вирусите от дивия тип и на двата резистентни мутантни щамове бяха изследвани по отношение на техните интрамолекулни и междумолекулни електростатични и хидрофобни взаимодействия. При резистентните мутанти беше установен специфичен стабилизиращ ефект на VP1 върху сглобяването на тетрамера, кооперативен ефект при свързването на лиганда и стерично възпрепятстване на достъпа до лиганд-свързващия джоб. Обсъжда се механохимична хипотеза, тълкуваща критично важната разлика между комплексите с участие на дизоксарил и палмитинова киселина.

28. Nikolova I, Galabov AS, Petkova R; **Chakarov S**; Atanasov B. Structural Basis of the Disoxaril Resistance and Dependence of Coxsackievirus B1. 22nd International Conference on Antiviral Research. Miami Beach, Florida, USA, May 03-07, 2009, A41.

Николова И, Гълъбов АС, Петкова Р; **Чакъров С**; Атанасов Б. Структурни основи на резистентността към и зависимостта от дизоксарил на Коксакивирус В1. Двадесет и втора международна конференция за изследователската дейност, свързана с развитие на антивирусни препарати, А41, Маями Бийч, Флорида, САЩ, 03-07 май 2009 г.

Това съобщение от конгрес е включено в supplement на списанието Antiviral Research 2009, 82(2), стр. A41-A41, DOI: 10.1016/j.antiviral.2009.02.086. Списанието има 5-додивен импакт индекс 4.185. Публикацията има едно последващо независимо цитиране в: Mustaffa M, Zhelev N. You cannot always WIN: molecular bases of the

resistance of picornaviruses to WIN compounds. Biotechnol Biotechnol Equip, 2012, 26(2), 2826-2828.

Дизоксарилът (WIN) инхибира инфекциозния потенциал на редица ентеро- и риновируси чрез свързване в хидрофобния джоб на капсидния белтък VP1, стабилизирайки по този начин вириона и блокирайки «разсъбличането» на вирусната нуклеинова киселина. Чрез селекция от див тип щам Коксакивирус В1, чувствителен към дизоксарил (Connecticut 5, CVB1/SOF) бяха получени резистентни вирусни щамове (CVB1/RES). След девет последователни пасажа на CVB1/RES мутантния вирус в присъствие на дизоксарил беше получен зависим от дизоксарил мутантен щам (CVB1/DEP). Изследванията с вариране на времето на добавяне на екзогенни компоненти върху CVB1/DEP показаха, че липсата на дизоксарил води до подтискане само на „разсъбличането” на вируса. Всички дизоксарилови мутантни щамове бяха фенотипно охарактеризирани. Беше проведен паралелен анализ за сравнение на VP1 секвенциите на CVB1/RES и CVB1/DEP мутантните щамове помежду си и с референтната секвенция на VP1 гена на Коксакивирус В1, депозирана в GenBank. В региона 195-255 аминокиселинен остатък изследваната секвенция на CVB1/RES се различаваше много от референтната. Като критично важни бяха преценени две точкови мутации, водещи до аминокиселинни замени – M213N и F237L, и двете в региона на лиганд-свързващия джоб. 3D – проектирането на CVA9 върху CVB3/B1 позволи пренасяне на две от координатите на WIN-лиганда в «каньона» на CVB1. Второто място е стерично забранено за лиганда при CVB1/SOF. Бяха генерирани над 100 модела, всеки от които беше анализиран чрез “clash analysis” за ротамери на страничните вериги. При CVB1/DEP заемането на място 1 е стерично затруднено, но място 2 може да бъде заето. WIN-молекула в място 2 взаимодейства със съседния VP2 белтък и капсомерите се свързват в пентамер. Това е едно добро обяснение защо мутантният CVB1/DEP вирус изисква наличие на WIN компонент, за да може да се сглоби вирусната частица.

29. Galabov AS, Nikolova I, Petkova R, **Chakarov S**, Atanasov B. Structural basis of disoxaril resistance and dependence of Coxsackievirus B1. Lecture Session, 4.3. Microbiologia Balkanika, 6th Congress of Balkan Microbiology and 4th Congress of Macedonian Microbiologists. 28-31 October 2009, Ohrid, Macedonia.

Гълъбов АС, Николова И, Петкова Р, **Чакъров С**, Атанасов Б. Структурни основи на резистентността към и зависимостта от дизоксарил на Коксакивирус В1, 4.3. Microbiologia Balkanika, Шести Балкански конгрес по микробиология и Четвърти конгрес на македонските микробиолози. 28-31 октомври 2009 г., Охрид, Македония.

30. Ivanova S, **Chakarov St**, Pankov R. A biosensor for assessing compatibility of new materials in regenerative and reparative medicine. Младежка научна конференция „Климентови дни, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, P57, 22-23 ноември, 2012, София, България.

Иванова С, **Чакъров Ст**, Панков Р. Биосензор за оценка на биосъвместимостта на нови материали за регенеративната и репаративната медицина. Младежка научна конференция „Климентови дни, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, P57, 22-23 ноември, 2012, София, България.

Доскорошната концепция, че изкуствените импланти трябва да бъдат „невидими” и инертни за околните тъкани вече се измества от схващането, че за постигане на успешна имплантация изкуствените материали, използвани за изработката на импланти трябва да наподобяват в максимална степен нормалното извънклетъчно обкръжение. Новите биомиметични материали трябва да осигуряват

триизмерно „скеле”, върху който да растат клетките на организма-гостоприемник, както и сигналите, необходими за осигуряване на адхезия на клетките, пролиферация, диференциация и формиране на нова тъкан, отлагаща собствен извънклетъчен матрикс. С напредъка на биоматериалознанието, полимерната химия и молекулярната биология, биоматериалите се развиват непрекъснато и в тази връзка е необходима бърза и надеждна методология за оценяване на тяхната биосъвместимост. Взаимодействието на клетката със субстрата започва с нейното „разстилане” върху повърхността и образуването на първични адхезивни контакти, които се развиват впоследствие до стабилни и организирани структури. Ефективен подход за оценка на повърхностната биосъвместимост е охарактеризирането на адхезивните контакти между клетката и субстрата. В настоящата работа ние представяме биосензор на основа живи клетки, с помощта на който могат да се оценят типът, площта и морфологичните характеристики на адхезивните контакти като индикатор за функционалното състояние на клетката и, респективно, за биосъвместимостта на изследваните материали. За разлика от молекулните биосензори, които детектират ефекта от само един, предварително определен фактор, клетъчните биосензори са сложни системи и предлагат предимството едновременно да приемат, обработват и реагират на множество и разнообразни сигнали, като например адхезивност, еластичност, химичен състав и топология. Ние трансфектирахме фибробластната клетъчна линия NIH/3T3 с два експресионни плазмидни конструкта и клонирахме клетките в условията на антибиотична селекция. Бяха получени клетки-биосензори, стабилно експресиращи два химерни флуоресцентно белязани белтъка, и по-точно GFP-тенсин и mCherry-винкулин/паксиллин (компоненти на фокалните и фибриларни адхезивни контакти). Оценката на състоянието на адхезивните контакти беше извършена чрез микроскопски анализ и анализ на изображения. С помощта на описаната методология могат да бъдат оценени количествено повърхностните качества на нови биоматериали за регенеративната медицина.

31. Chicheva Z, Chelenkova P, Petkova R, Chamova T, Jelyazkova-Glaveeva S, Tournev I, **Chakarov St.** Repair plan vs. plan repair - a panel for assessment of individual repair capacity under physiological and pathological conditions. Младежка научна конференция „Климентови дни, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, P58, 22-23 ноември, 2012, София, България.

Чичева З, Челенкова П, Петкова Р, Чамова Т, Желязкова-Главеева С, Търнев И, **Чакъргов Ст.** Панел за оценка на индивидуален репаративен капацитет във физиологични и патологични условия. Младежка научна конференция „Климентови дни, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, P58, 22-23 ноември, 2012, София, България.

Индивидуалният капацитет за поправка на всекидневно възникващите увреждания в ДНК или на специфични лезии (възникващи, например, вследствие на генотоксично въздействие на фактори на околната среда или на ятрогенна намеса, напр. химио- или радиотерапия) може да се използва като надежден маркер за капацитета за поддържане на интегритета на генома и оценка на способността за индукция към апоптоза. В практически всички гени, кодиращи продукти, които вземат участие в поправката на ДНК и индуцирането на програмираната клетъчна смърт вследствие на увреждания са установени полиморфни варианти, които имат модулиращо действие за разпознаване на уврежданията в ДНК или ефективността на поправката им. Тези полиморфизми влияят върху поправката на ДНК в малък мащаб, но това е в крайна сметка довежда до диференциално разпределение в склонността към развитие на различни заболявания и състояния, продължителността на живота, и приложимостта на

различни видове терапии. Ние разработихме панел от маркери за оценка на индивидуалния репаративен капацитет (XPCins83PAT, P53P72R, ERCC1C8092A, темп на скъсяване на теломери), който беше приложен за оценка на вариациите в ефективността на поправката на ДНК и самоподновяването на клетките и тъканите при здрави индивиди от български произход. Получените резултати разкриват някои специфични особености на структурата на популацията, които по всяка вероятност са следи от селекционни течения, случили се в историческо отдалечено от сегашния момент време. Също така беше проведено предварително проучване на вариантността на изброените маркери при извадка от пациенти със съдови заболявания с цел да бъде оценен капацитетът за поправка на окислителни увреждания и склонността към индукция към апоптоза в увредените тъкани. Панелът за оценка на индивидуален репаративен капацитет по-нататък може да бъде разгърнат и модифициран за оценка на риска от развитие на различни заболявания и състояния или, когато съответните заболявания вече са се развили, за оценка на риска от усложнения.

32. Chelenkova P, Petkova R, Yochev S, Chakarov St. Half trout, half salmon, all wrong. Evidence of inbreeding and genetic admixture of related species in Bulgarian natural brown trout populations. Младежка научна конференция „Климентови дни, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, P59, 22-23 ноември, 2012, София, България.

Chelenkova P, Petkova R, Yochev S, **Chakarov St.** Evidence of inbreeding and genetic admixture of related species in Bulgarian natural brown trout populations. Младежка научна конференция „Климентови дни, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, P59, 22-23 ноември, 2012, София, България.

Естествени популации на кафява пъстърва (*Salmo trutta fario*) се срещат в много от студеноводните реки в Европа. Този вид често се развъжда изкуствено в българските и европейските рибовъдни стопанства, като се използва местно произведен или внесен от чужбина зарибителен материал. Прозиходът на вноския зарибителен материал често е Северна Европа, където често се отглеждат рутинно и други салмонидни видове освен кафявата пъстърва, каквато е например атлантическата съомга (*S. salar*). От данните, публикувани в специализираната литература е известно, че нивото на хибридите между кафява пъстърва и съомга достига до над 10 % в някои пъстървови популации в Северна и Западна Европа, и, съответно, пред отговорните европейски органи е надлежно докладвано за потенциалните проблеми, свързани с риска от интрогресия. Ние намерихме необичайно високо ниво на съомгово-пъстървови хибриди в представителна извадка от индивиди от българските естествени популации на *S. trutta fario*. Прозиходът на хибридите вероятно е от случайно изпуснати или целенасочено освободени в природните водни басейни хибридни риби и/или от зарибяване със зарибителен материал, замърсен с жизнеспособни и плодовити хибриди. Състоянието на генетичното разнообразие на българските естествени популации на кафява (балканска) пъстърва вече е тревожно, като се има предвид, че в предходна работа открихме следи от инбридинг, който вероятно е резултат от неволно или целенасочено освобождаване в естествените водни басейни на зарибителен материал, получен от изкуствено осеменяване в рибовъдните стопанства. Желателно е да се вземат мерки с цел да бъде предотвратена по-нататъшна намеса в генетичния пул на естествените популации на кафявата пъстърва в България.

33. Arabadjiev B, **Chakarov St**, Momchilova A, Pankov R. BMP induced differentiation of hESC. Младежка научна конференция „Климентови дни, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, Р60, 22-23 ноември, 2012, София, България.

Арабаджиев Б, **Чакърров Ст**, Момчилова А, Панков Р. BMP-индуцирана диференциация на чЕСК. Младежка научна конференция „Климентови дни, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, Р60, 22-23 ноември, 2012, София, България.

Човешките ембрионални стволови клетки (чЕСК) са плурипотентни клетки от вътрешната клетъчна маса (ВКМ) на премплантационни бластоцисти, получени от *in vitro* оплождане. ЕСК могат да се диференцират до практически всички типове клетки, изграждащи възрастния организъм. Малка популация от тези клетки имат различна съдба от останалите клетки на ранния ембрион, залагайки популацията на примордиалните герминативни клетки, които впоследствие образуват половата тъкан на развиващия се ембрион. В настоящата работа ние демонстрираме получаване чрез диференциация *in vitro* на различни клетъчни типове от предходно получените от нас линии В и В2 от човешки ембрионални стволови клетки. Някои от тези клетъчни типове бяха получени чрез спонтанна диференциация, докато други бяха получени чрез насочена диференциация с използване на морфогенни фактори (костни морфогенни белтъци, BMP), които да насочат клетките към диференциация в желана посока. BMP са мултифункционални цитокини, отнасящи се към суперфамилията на трансформиращ растежен фактор- β . Използвахме комбинация от BMP-4, BMP-7 и BMP8b в присъствие на говежди фетален серум с цел диференциация до VASA-позитивни клетки, подобни на герминативни клетки от адхерентни култури на чЕСК от линия В1. При прибавяне на BMP-4 към средата за култивиране на ембрионни телца, отглеждани в суспензионна култура, се увеличаваше честотата на поява на ритмично пулсиращи кардиомиоцити в тях. Това беше очакван ефект, тъй като сигнализацията с участие на BMP играе важна роля при индукцията на поява на мезодермални структури в индивидуалното развитие при гръбначните, включително и развитието на сърдечно-съдовата система. Наблюдавахме и спонтанна диференциация на чЕСК от линии В1 и В2 до невроноподобни клетки, които са производни на различен от мезодермалния ембрионален слой, а именно на ектодермата, което е свидетелство за капацитета за диференциация на получените от нас човешки ембрионални клетъчни линии.

След присъждане на академичното звание „доцент“:

34. Pavlina Chelenkova, Rumena Petkova, Isabella D’Ascanio, Nikolai Zhelev, **Stoyan Chakarov**. In sickness and in health: a set of markers for individual repair capacity in risk assessment, monitoring and prognosis of human disease. European Biotechnology Congress 16-18 May 2013, Bratislava, Slovakia Poster session. Published in: Current Opinion in Biotechnology, Volume 24, Supplement 1, Page S105 (July 2013) - abstracts of the European Biotechnology Congress 2013. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.05.322>

Павлина Челенкова, Румена Петкова, Изабела Д’Асканио, Николай Желев, **Стоян Чакърров**. Набор от маркери за оценка на индивидуалния репаративен капацитет при оценка на риска, мониторинг и прогноза на болестите при човека. European Biotechnology Congress 16-18 May 2013, Bratislava, Slovakia Poster session. Published in: Current Opinion in Biotechnology, Volume 24, Supplement 1, Page S105 (July 2013) - abstracts of the European Biotechnology Congress 2013.

Това съобщение от конгрес е включено в supplement на списанието Current Opinion in Biotechnology (Volume 24, Supplement 1, Page S105, July 2013) - abstracts of the European Biotechnology Congress 2013. DOI: 10.1016/j.copbio.2013.05.322. Списанието

има 5-годишен импакт индекс 8.180. Публикацията има три последващи независими цитирания:

- Uth K, Sleight R. *Deregulation of the circadian clock constitutes a significant factor in tumorigenesis: a clockwork cancer. Part II. In vivo studies.* *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2014, 28(3), 379-386.

- Uth K, Trifonov D. *Stem cell application for osteoarthritis in the knee joint: A minireview.* *World J Stem Cells*, 2014 November 26; 6(5): 629-636. DOI: 10.4252/wjsc.v6.i5.629.

- Nayyar A, Chakalova L. *APOE4, oxidative stress and decreased repair capacity - a no-brainer. Faulty lipid metabolism and increased levels of oxidative damage may be risk factors in the pathogenesis of late-onset dementia.* *BioDiscovery* 2015; 17: 1; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2015.17.1

Широкото понятие „индивидуален репаративен капацитет“ (ИРК) обхваща поправка на увреждания в ДНК, от една страна, и капацитета за подновяване на тъканите, от друга страна. Капацитетът за подновяване на тъканите е свързан с количеството непоправени ДНК увреждания, но също така и други фактори – както генетични, така и с негенетична природа могат да играят роля за това увредените клетки да бъдат подменени или да им се даде възможност за поправяне на увреждането. Много човешки гени, кодиращи продукти с функция в поправката на ДНК и свързаната с увреждането програмирана клетъчна смърт могат да съществуват в повече от една полиморфни форми, всяко от които е свързана с промяна на капацитета за поправка на ДНК. Тази промяна обикновено е лека, но достатъчно значима, така че да повишава риска от развитие на различни болести и състояния, да влияе върху хода и изхода от тях и потенциалните усложнения, да предсказва повече или по-малко успешен изход от конкретен тип терапия, и пр. Ние разработихме набор от молекулни маркери за оценка на индивидуалния репаративен капацитет (ХРСins83, P53P72R, ERCC1C8092A, скорост на скъсяване на теломери), който използвахме за оценка на вариантността в ефективността на поправката на ДНК и подновяването на тъканите при здрави индивиди и при индивиди с инсулти. Резултатите от нашите изследвания насочват към наличие на евентуална връзка между намаления капацитет за поправка на окислителни увреждания в ДНК и риска от усложнения след съдов инцидент. Наборът маркери за оценка на ИРК може потенциално да бъде използван за оценка на риска от развитие на различни заболявания или, ако заболяването вече се е развило, за прогностикация на изхода от него и/ли риска от усложнения.

35. М. Belouhova, I. Schneider, **S. Chakarov**, I. Ivanova, Y. Topalova. *Microbial community development of biofilm in amaranth decolorization technology analyzed by FISH.* Младежка научна конференция „Климентови дни“, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски“, 21-23 ноември, 2013, София, България. Пленарен доклад, сесия II.

Белоухова М, Шнайдер И, **Чакъров Ст**, Иванова И, Топалова Я. Анализ чрез FISH на микробното съобщество на биофилми при обезцветяване на Амарант. Младежка научна конференция „Климентови дни“, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски“, 21-23 ноември, 2013, София, България. Устно съобщение, сесия II.

Ключови фактори при обезвреждането на отпадни води, включително и от токсични замърсители, са микробната структура и функцията на биологичните системи – биофилми и активирани утайки. Важно е да бъдат изяснени броят, взаимоотношенията и местоположението на основните адаптивни микробни доминанти в технологичните биофилми, както и връзката между тези параметри с регулацията на

ключови ензимни активности и ефективността на обезвреждането на отпадните води. Познаването на изброените параметри и взаимовръзките между тях разкрива възможности за ефективно управление и потенциално развитие на технологиите. За да се постигне това, е необходимо приложение на различни подходи (молекулярен, микробиологичен, ензимологичен и технологичен).

Целта на проучването беше да се изясни ролята, пространственото разпределение и взаимоотношенията между бактерии от р. *Pseudomonas* в биофилми в хода на полупрекъсната обезцветяваща технология към Амарант в моделни пясъчни биофилтри чрез използване на комбинация от моделиране на технологични процеси, FISH и plate count техника.

Като моделна система беше използван полупрекъснат процес на третиране на синтетични отпадни води с Амарант (увеличаваща се стъпаловидно концентрация от 10 до 45 mg/l). Беше използван специфичен адаптационен алгоритъм като фактор за биоусилването на азо-разграждащи бактерии. Ранната и късната фаза на процеса бяха разграничени по входящата концентрация на Амарант, ефективността и скоростта на разграждане на азо-багрилото.

Бяха изследвани следните параметри, характеризиращи функционалността на биофилма, поотделно и като взаимоотношения помежду им в критични пунктове в хода на процеса: технологични параметри; ключови ензимни активности от пътя на биоразграждането на Амарант (азоредуктаза, сукцинат дехидрогеназа, катехол-1,2-диоксигеназа, катехол-2,3-диоксигеназа); брой азо-разграждащи бактерии и бактерии от р. *Pseudomonas* (определени чрез plate count техника); количеството и разположението на бактерии от р. *Pseudomonas* чрез флуоресцентна ин ситу хибридизация (FISH).

Резултатите показаха, че увеличаването на ефективността на разграждане на Амарант от 92.40 % до 93.35 % е съпроводено от увеличение на ензимните активности в биофилма. Азоредуктазната активност се увеличи с 25.90%, а сукцинатдехидрогеназната активност - с 10.61%. Определянето на ензимни активности показва липса на активност на катехол-1,2-диоксигеназата и на катехол-2,3-диоксигеназата в ранната фаза, но в късна фаза активностите на същите диоксигенази бяха много високи (2.76 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ белтък и 1.74 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ белтък, съответно). В началото на процеса (0-191 h) броят на култивируемите микроорганизми от р. *Pseudomonas* се увеличи с 48.76%. Количеството на култивируемите бактерии от р. *Pseudomonas* намаля в късната фаза (191-455 h) с 15.25%, но в същото време количеството на некултивируемите синергични бактерии от този род се увеличи с 23.26%.

Данните от FISH анализа изясниха механизма на формиране на биофилма и показаха локализацията на най-активните биоразграждащи бактерии, както и увеличена плътност на техните популации. Получените данни са важни по следните причини: i) бяха идентифицирани доминантни микробни фактори в комплексната структура на микробоценозата (биофилма) в хода на технологичния процес; ii) бяха разкрити интимните механизми на увеличението на скоростта и обхвата на детоксикацията детоксикацията в рамките на комплексен процес за обезвреждане на отпадни води.

36. Rossitsa Hristova, Yulia Petseva, Iskra Yanakieva, Mihaela Peycheva, Rumena Petkova, Anastas Gospodinov, **Stoyan Chakarov**, Lyubomira Chakalova. The human foetal globin genes exhibit a two-wave pattern of transcription in primary erythroid cultures. Младежка научна конференция „Климентови дни”, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, 21-23 ноември, 2013, София, България. Постерна сесия, P22.

Росица Христова, Юлия Пецева, Искра Янакиева, Михаела Пейчева, Румена Петкова, Анастас Господинов, **Стоян Чакъров**, Любомира Чакалова. Транскрипцията на човешките фетални глобинови гени в първични еритроидни култури показва двуфазен профил. Младежка научна конференция „Климентови дни”, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, 21-23 ноември, 2013, София, България. Постерна сесия, P22.

Човешките бета-глобинови гени (HBE1, HBG1, HBG2, HBV и HBD) са разположени в рамките на 50 kb участък върху хромозома 11. Тяхната експресия е тъканно-специфична и показва диференциална регулация време на индивидуалното развитие. Гама-глобиновите гени HBG1 и HBG2 се експресират на високи нива във фетуса и кодират гама-глобиновите вериги на феталния хемоглобин. Към термина, експресията на феталните глобинови гени силно се подтиска и експресията се превключва предоминантно към бета-глобина, характерен за възрастния индивид. Като резултат, скоро след раждането феталният хемоглобин се замества почти напълно с хемоглобина, характерен за възрастните. Вече няколко изследователски групи, обаче, намират, че еритроидните клетки от възрастни индивиди експресират за кратко време феталните HBG гени. За да проучим по-подробно това, ние изследвахме динамиката на експресия на HBG и HBV гените в хода на еритроидната диференциация. Използвахме еритроидни прогениторни клетки, получени от човешка периферна кръв, стимулирани *in vitro* към диференциация в посока еритроидна линия. С помощта на РНК флуоресцентна *in situ* хибридизация (RNA-FISH) ние анализирахме транскрипцията на HBG и HBV гените в индивидуалните бета-глобинови локуси на няколко етапа от куртивирането. Резултатите показаха, че на по-ранни етапи от куртивирането, почти половината от клетките транскрибират гена HBG. Броят на тези активно експресирани локуси впоследствие значително намалява. Тези резултати подкрепят схващането, че в процеса на еритроидната диференциация гените се активират и впоследствие постепенно експресията бива подтисната. Неочаквано, в късните стадии на куртивирането наблюдавахме втора вълна на транскрипция на гена HBG. Нашите резултати показват, че вторичното активиране на транскрипцията на гена HBG се дължи на забавена диференциация на специфични прогениторни клетки в периферната кръв. Резултатите подкрепят схващането, че HBG гените се активират и впоследствие транскрипцията им се подтиска индивидуално в диференциращите се клетки. Активирането и подтискането на експресията на гена HBG вероятно се осъществяват на точно определени етапи от диференциацията на нормалните еритроидни прогенитори при възрастния индивид.

Информацията за механизмите, контролиращи експресията на глобиновите гени може да бъде полезна при развитието на клинични подходи за лечение на разстройствата на синтеза на хемоглобина. Наследствените хемоглобинопатии са най-често срещаните моногенни заболявания при човека. Натрупани са голямо количество данни, свидетелстващи, че повишените нива на феталния хемоглобин подобряват състоянието на пациентите с разстройства на синтеза на бета-глобина. Поради това, значителни изследователски усилия са насочени в посока фармакологична индукция на експресията на гените, кодиращи феталния глобин. Няколко вещества са изследвани за възможността им да стимулират продукцията на фетален хемоглобин при възрастни индивиди, включително хематопоетични фактори, цитокини и химиотерапевтици като 5-азациитидин и хидроксиурея. Досега, обаче, идентифицираните агенти имат цититоксично действие и/или са потенциални карциногени и ефектът им върху експресията на феталния хемоглобин е ограничен. Поради това е важно да се разкрият молекулярните механизми на превключването между фетален и „възрастен“

хемоглобин, което може да подпомогне разработването на безопасни за използване фармакологични агенти с широко приложение.

37. Pavlina Chelenkova, Rumena Petkova, Teodora Chamova, Sashka Jelyazkova, Ivaylo Tournev, **Stoyan Chakarov**. The XPCins83 polymorphism in its homozygous state may exert an independent protective effect against cerebrovascular incidents in the Bulgarian population. Младежка научна конференция „Климентови дни”, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, 21-23 ноември, 2013, София, България. Постерна сесия, P31.

Павлина Челенкова, Румена Петкова, Теодора Чамова, Сашка Желязкова, Ивайло Търнев, **Стоян Чакъров**. Носителството на „дивия тип“ алел на XPCins83 може да има независим протективен ефект срещу мозъчно-съдови инциденти в българската популация Младежка научна конференция „Климентови дни”, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, 21-23 ноември, 2013, София, България. Постерна сесия, P31.

Носителството на вариантни алели в гени, кодиращи белтъчни продукти с участие в поправката на ДНК може да играе роля във формирането на риска от развитие на множество мултифакторни болести и състояния с късно начало. Анализирахме генотиповете на 68 индивида на възраст 20-65 г. с мозъчно-съдова болест и 73 подбрани по възраст клинично здрави индивиди по отношение на често срещаните полиморфизми TP53 P72R, XPCins83 и ERCC1 C8092A с цел да изясним наличието на вариантност, която може да играе роля за риска от мозъчно-съдова болест в българската популация. Разпределението на алелите на полиморфизмите TP53 P72R и ERCC1 C8092A в двете изследвани групи не показва отклонение от равновесието на Hardy-Weinberg и подкрепяше предходни наши публикувани данни за българската популация. Алелното разпределение на полиморфизма XPCins83, обаче, показва някои особености в една от изследваните от нас групи. По-точно, разпределението на „дивия тип“ (репаративно-компетентен, делеционен) алел и „вариантния“ (репаративно-дефектен, инсерционен) алел в контролната група показва статистически значимо отклонение от равновесието на Hardy-Weinberg ($P < 0.0001$), с излишък на хомозиготи по делеционния алел (52 % в контролната група и 32 % в пациентската група). „Репаративно-дефектния“ инсерционен алел на полиморфизма XPC беше откриван с малко по-висока честота в пациентите с история за мозъчно-съдови инциденти (предимно в хетерозиготно състояние), отколкото при здрави контроли, където най-често срещаният генотип беше хомозиготният по делеционния алел. Най-често срещаният композитен генотип (TP53 P72R, XPCins83, ERCC1 C8092A) в контролната група беше (RR, del/del, CC), докато най-често срещаният генотип в пациентската група беше (RR, ins/del, CC). Възможно е „репаративно-компетентният“ делеционен алел на полиморфизма XPCins83 да е свързан с предимство за хомозиготните носители по отношение на риска от мозъчно-съдови инциденти независимо от статуса по отношение на полиморфизмите TP53 P72R и ERCC1 C8092A. Тъй като белтъкът XPC участва само при разпознаването на увреждания в нетранскрибирани участъци на генома, един лек дефицит на неговата функция би могъл да има осезаемо значение само при клетки, които са подложени на бърз естествен обмен. Такива са епителните и ендотелните клетки, особено в участъци на съдовата стена с ниска устойчивост, каквито са местата на атеросклеротични лезии. Носителството на един или повече „репаративно-дефектни“ инсерционни алели на полиморфизма XPC у индивиди с генотип, съдържащ R алела на полиморфизма TP53 P72R (PR, RR) може да повиши риска от смърт на клетките по съседство при нарушение на целостта на ендотела на мозъчните съдове. Възможно е хомозиготният „репаративно-компетентен“ генотип по отношение на

полиморфизма XPCins83 да оказва слаб протективен ефект дори при носители на „про-апоптотичния“ R/R генотип по отношение на полиморфизма TP53 P72R.

38. Jordan Doumanov, Virginia Dolchinkova, Kirilka Mladenova, Radoslav Alexandrov, Georgi Danovski, **Stoyan Chakarov**, Svetla Petrova. Altered surface properties of MDCK-hBEST1 cells treated with toxic sPLA2. Младежка научна конференция „Климентови дни“, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски“, 21-23 ноември, 2013, София, България. Постерна сесия, P36.

Йордан Думанов, Виржиния Долчинкова, Кирилка Младенова, Радослав Александров, Георги Дановски, **Стоян Чакъров**, Светла Петрова. Промени в повърхностните качества на клетките MDCK-hBEST1, третирани с токсична sPLA2. Младежка научна конференция „Климентови дни“, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски“, 21-23 ноември, 2013, София, България. Постерна сесия, P36.

Випоксинът е хетеродимерен невротоксичен комплекс, изолиран от отрова на *Vipera amodytes meridionalis*. Той е изграден от алкалната силно токсична A2 субединица на фосфолипазата (Ca^{2+} -зависима секреторна фосфатидат-sn-ацилхидролаза, фосфолипаза A2, EC 3.1.1.4, sPLA2) и кисел нетоксичен и каталитично неактивен компонент (VAC). В присъствие на естествени субстрати (клетъчни мембрани), випоксинът се дисоциира и се свързва само токсичната sPLA2 субединица, което е свързано с разнообразни фармакологични ефекти (невротоксичност, хемотоксичност, анткоагулация, цитотоксичност, миотоксичност и пр.).

sPLA2 субединицата на випоксина е структурно идентична с човешката секреторна PLA2, която е свързана с отделяне на локални трансмитерни субстанции, предизвикващи възпаление (ревматизъм, артрит, псориазис) и болка и има значение за регулацията на кръвното налягане, хемостазата, репродуктивните функции, съня, както и за пътищата на сигнална трансдукция, отговорни за клетъчната пролиферация и смърт. Секреторната sPLA2 може да се използва като инструмент за изучаване на електростатичните и електрокинетични свойства на мембраната.

В настоящата работа представяме промяната на електрокинетичните свойства на Madine-Darby Canine Kidney (MDCK) епителни клетки и MDCK клетки, стабилно трансфектирани с ген, кодиращ човешкия белтък Best1 (hBest1) (MDCK-hBest1). hBest1 е трансмембранен белтък, преобладаващо експресирани от базолатералната плазмемембрана на ретиналните пигментни епителни клетки (RPE) в окоото при човека, където той действа като Ca^{2+} -активируем хлорен канал с важна роля в поддържането на очната хомеостаза. Тъй като Ca^{2+} -зависимите фосфолипази имат важна роля в патофизиологията на болестите на окоото, ние изследвахме ефекта на sPLA2 върху ролята на hBest1 в MDCK клетки.

Електрофоретичната подвижност (ЕП) беше измерена чрез микроелектрофореза с помощта на цитоферометър OPTON (Австрия). Сравнихме MDCK и MDCK-hBest1 клетки след третиране с 1) випоксин комплекс; и 2) сепарираните и пречистени субединици sPLA2 и VAC.

Нашите резултати показаха по-висока отрицателна ЕП и ξ потенциал на третирани с $3.58 \text{ nm PLA2}/1.14 \times 10^5$ MDCK-hBest1 клетки (в PBS) поради увеличаване на отрицателен електричен заряд на външната повърхност на мембраните. Беше изследвано влиянието на PLA2 върху дзета потенциала на клетките. Беше намерено увеличение на ξ потенциала на MDCK-hBest1 клетките при третиране с PLA2 (от $\xi = 19.41$ до $\xi = -17.93 \text{ mV}$) и увеличение на плътността на повърхностния заряд до $\sigma = 0.0142 \text{ C m}^{-2}$. Значителните разлики в повърхностния заряд между MDCK и MDCK-hBest1 клетки показаха, че hBest1 стабилизира трансфектираната клетъчна линия в сравнение с конвенционалната клетъчна линия.

39. Tatyana Vlaykova, Mateusz Kurzawski, Tanya Tacheva, Dimo Dimov, Maya Gulubova, Petya Peeva, **Stoyan Chakarov**, Marek Drozdziak. Investigation of the role of the MMP3 -1117insA polymorphism in cutaneous malignant melanoma – a preliminary study. Младежка научна конференция „Климентови дни”, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, 21-23 ноември, 2013, София, България. Постерна сесия, Р42.

Татяна Влайкова, Матеус Куржавски, Таня Тачева, Димо Димов, Мая Гълъбова М, Петя Пеева, Стоян **Чакъров**, Марек Дрозджик. Изследване на ролята на полиморфизма MMP3 -1171insA при злокачествен кожен меланом – предварителни проучвания. Младежка научна конференция „Климентови дни”, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, 21-23 ноември, 2013, София, България. Постерна сесия, Р42.

Ходът на заболяването при пациентите със злокачествен кожен меланом е трудно прогнозируем. То може да не се прояви с години, но може и да има много агресивен ход и да даде метастази рано. Разграждането на базалните мембрани и извънклетъчния матрикс е основен механизъм при инвазия на съседни тъкани и метастазиране. Матриксните металопроотеинази (MMPs) и техните тъканни инхибитори (TIMPs) играят ключова роля в този механизъм. Матриксните металопроотеинази (MMP) са голяма фамилия цинк-зависими ендопептидази, които могат да разградят практически всички компоненти на извънклетъчния матрикс. Активността на MMP се контролира стриктно на ниво транскрипция на гена, активиране на латентния зимоген и инхибиране от ендогенни инхибитори. Повечето от гените, кодиращи MMP, показват високо ниво на полиморфизъм и имат алел-специфични ефекти върху транскрипционната активност на съответния ген или върху ензимната активност на кодиращия продукт.

MMP-3, наричан още и стромелизин-1 беше една от първите протеинази, за които беше установена асоциация с туморния растеж. Той може да хидролизира фибронектина, колагени тип IV, V, IX и X, еластина, ламинините, желатина и протеогликановия коров протеин. Може също така и да активира про-ензимите на другите MMP, включително и колагенази MMP-1 и MMP-13.

Генът, кодиращ MMP-3 се намира на позиция 11q23 в близост до локуса за MMP-1. В гена MMP3 беше намерена инсерция/делеция на А в позиция -1171 в промоторния участък на гена, която засяга нивото на експресия на гена. Този промоторен полиморфизъм анализ (5A/6A, MMP3 -1171insA, rs3025058) предизвиква повишаване на транскрипционната активност при 5A хомозиготите близо 2 пъти повече, отколкото при 6A хомозиготите.

Целта на настоящото пилотно изследване беше да се проучи връзката между полиморфизма MMP3 -1171insA с злокачествения меланом на кожата в група български пациенти (n=26) и здрави контроли (n=172). Изследването беше проведено чрез PCR-RFLP.

Изследваната от нас извадка от генотипове се подчиняваше на закона на Hardy-Weinberg. Резултатите не показаха статистически значима разлика в алелните честоти и честотата на срещане на генотиповете на полиморфизма MMP3 -1171insA при пациентите с меланом и здравите контролни индивиди при първични анализ (p=0.360 и 0.790, χ^2 -тест), както и при подбор на пациенти и контроли по възраст и пол. Сравнението на някои клинични характеристики между пациентите с различни генотипове покава по-висока преживяемост при пациентите с генотип 6A/6A в сравнение с пациентите – носители на алела 5A (5A/5A+5A/6A genotypes, p=0.118, Log rank тест).

Резултатите от настоящото предварително проучване не подкрепят ролята на промоторния полиморфизъм -1171insA в гена MMP3 като рисков фактор за развитие на кожен меланом, но е възможно този полиморфизъм да има значение за прогресията на заболяването. Необходими са по-обширни изследвания, за да може да бъде потвърдена евентуалната роля на промоторния полиморфизъм в гена MMP3 като прогностичен фактор при кожен меланом.

40. Tacheva T, Chelenkova P, Dimov D, Chakarov I, Petkova R, **Chakarov S**, Vlaykova T. Frequency of the common polymorphism MMP2 – 1306 C>T in a population from central Bulgaria. Младежка научна конференция „Климентови дни”, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, 21-23 ноември, 2013, София, България. Постерна сесия, P43.

Тачева Т, Челенкова П, Димов Д, Чакъров И, Петкова Р, **Чакъров Ст**, Влайкова Т. Честота на промоторния полиморфизъм MMP2 -1306 C>T в популация от централна България. Младежка научна конференция „Климентови дни”, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, 21-23 ноември, 2013, София, България. Постерна сесия, P43.

Матриксните металопротеинази (ММР) са фамилия високохомоложни извънклетъчни Zn^{2+} -зависими неутрални ендопептидази, познати също под името матриксини. Те могат да разградят практически всички компоненти на извънклетъчния матрикс; базални ламини; фактори на кръвосъсирването; адхезионни молекули, функциониращи в междуклетъчната сигнализация и сигнализацията между клетката и извънклетъчния матрикс; мембранно-свързани прекурсорни форми на растежните фактори, белтъци, свързващи растежни фактори; рецептори за растежни фактори; други протеинази протеиназни инхибитори, както и собствените си неактивни зимогени.

MMP-2 (72 kDa колагеназа тип IV, желатиназа А) и MMP-9 (92 kDa колагеназа тип IV, желатиназа В) участват в разграждането на денатурирани колагенови молекули (желатини); колагени тип IV, V, IX и X и еластина. Счита се, че желатиназите играят ключова роля в различни физиологични процеси, сред които развитието на ембриона, инвазията на трофобласта, ангиогенезата, трансмиграцията на Т-клетките и зарастването на раните, както и в развитието и прогресията на огромна част от патологичните процеси.

Повечето от гените, кодиращи ММР, включително MMP-2, показват високо ниво на полиморфизъм. Съществуват множество данни, че нивото на експресия на MMP-2 зависи от полиморфизми в промоторния участък на гена. Един от еднонуклеотидните полиморфизми с функционална активност е транзицията MMP2 1306C>T (rs243865), разположена в коровата последователност за разпознаване от Sp1 (CCACC бокс), което води до значително намаление на активността на промотора поради унищожаване на мястото за свързване за Sp1.

Целта на настоящото изследване беше да се оцени алелната честота и честотата на срещане на генотиповете на този често срещан промоторен полиморфизъм в гена MMP2 при 75 индивиди от централна България и да сравним нашите резултати с тези от други популационни проучвания.

Установихме, че 76.0% от случайно подбраните индивиди в извадката са носители на генотипа CC, 17.3% - на генотипа CT и 6.7% на генотипа TT. Честотата на по-рядко срещания алел беше 15.3%. Така получените честоти за срещане на генотипове се различаваха от получените за други популации от Индоевропейската раса (USA - 55/38/7, MAF 26%; Холандия - 52.8/40.5/6.7, MAF 26.9%; Австрия - 55.6/35.5/8.9, MAF 27.2%), но бяха близки до стойностите, публикувани за разпределението на честотите в световен мащаб (75.3/21.3/3.4, MAF 14%).

41. Pavlina Chelenkova, Teodora Chamova, Sashka Zheliazkova, Ivaylo Tournev, **Stoyan Chakarov**, Rumena Petkova. The apolipoprotein E polymorphism alone may not be a reliable genetic predictor for the risk of hemorrhagic stroke and post-stroke cognitive decline in the Bulgarian population unless supported by other biomarkers. Младежка научна конференция „Климентови дни”, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, 21-23 ноември, 2013, София, България. Постерна сесия, Р44.

Челенкова П, Чамова Т, Желязкова С, Търнев И, **Чакъров С**, Петкова Р. Полиморфизмът в гена АРОЕ сам по себе си не е надежден предиктор за риска от инсулт и постинсултен когнитивен упадък в българската популация, а трябва да бъде подкрепен и с данни от други маркери. Младежка научна конференция „Климентови дни”, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, 21-23 ноември, 2013, София, България. Постерна сесия, Р44.

Аполипопротеин Е е експресиран от практически всички тъкани белтък, който играе роля за свързването, интернализацията и катаболизма на липопротеиновите частици. Основните изоформи на човешкия АРОЕ са три (Е2, Е3 и Е4), кодирани съответно от алелите епсилон (ϵ) -2, -3 и -4. Известно е, че носителството на алелите $\epsilon 2$ и $\epsilon 4$ е свързано с повишен риск от съдова патология (вътречерепен кръвоизлив вследствие на амилоидна ангиопатия) и влияе върху прогнозата след инсулт (специфично, върху риска от постинсултен когнитивен упадък). Изследвахме статуса за носителство на полиморфни алели на гена за аполипопротеин Е при български пациенти с инсулти и подбрани по възраст здрави контроли без история за инсулт и без обективни данни за когнитивни нарушения. Честотата на алела $\epsilon 4$, за който по литературни данни е намерена връзка с повишен риск от когнитивен упадък при много неврологични заболявания, беше сравнима в двете изследвани групи. Честотата на алела $\epsilon 2$, за който предходно други автори са намерили връзка с повишен риск от вътречерепен кръвоизлив, беше два пъти по-висока в групата на здравите контроли, отколкото в групата на пациентите с инсулти. Най-често срещаният алел $\epsilon 3$ беше със статистически значима ($P=0.01$) по-висока честота на срещане сред пациентите с инсулти, отколкото при здравите контроли, като хомозиготният $\epsilon 3/\epsilon 3$ генотип се срещаше с над 20 % по-рядко при здравите контроли, отколкото при пациентите. Възможно е статусът на носителство по отношение на полиморфизма АРОЕ да не представлява надежден маркер за оценка на риска от вътречерепен кръвоизлив и риск от когнитивен упадък след инсулт при българските пациенти. Предиктивната стойност на АРОЕ като маркер може да нарасне, ако бъде подкрепена с данни от анализ на други биомаркери, включително полиморфизми в гените, кодиращи фактори на кръвосъсирване и маркери за индивидуален капацитет за поправка на клетъчни увреждания.

42. Chelenkova P, Petkova R, **Chakarov S**. Individual capacity for maintenance of genomic integrity - a novel tool in the assessment of the risk for common adult-onset human diseases and conditions and their late complications. Първа национална конференция по биотехнология, 17-18 октомври 2014, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, София, България. Пленарен доклад, сесия I, Направление "Биотехнологии и здраве“.

Челенкова П, Петкова Р, **Чакъров С**. Индивидуалният капацитет за поддръжка на геномния интегритет като нов инструмент в оценката на риска от развитието на често срещани болести и състояния с късно начало при човека и техните потенциални усложнения. Първа национална конференция по биотехнология, 17-18 октомври 2014,

Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, София, България. Пленарен доклад, сесия I, Направление "Биотехнологии и здраве“.

Доскоро, често срещаните болести и състояния с късно начало (затлъстяване/инсулинова резистентност/ диабет тип 2; хиперхолестеролемия/ атеросклероза/ сърдечно-съдови заболявания; неврологични заболявания; някои типове тумори, и др.) бяха считани до голяма степен на кумулативен резултат от особености в начина на живяне, независимо че отдавна е известно, че голяма част от тези заболявания показват тенденция за фамилност. Вече се знае, че генетичното предразположение играе значителна роля за формирането на риска от болести с късно начало, въпреки че някои фактори на околната среда (особености на диетата и двигателния режим, тютюневия дим, и др.) могат да увеличат или намалят риска, обусловен от генетичния „багаж“ на индивида. Настоящата работа анализира основните ефекти на носителството на често срещани полиморфизми в гени, кодиращи белтъци, които участват в детекцията на увреждания в ДНК и свързаната с това сигнализация, поддръжка на геномния интегритет (TP53 P72R, XPC ins83); специфични механизми за поправка на ДНК - NER (XPC ins83, ERCC1 C8092A; XPD Lys751Gln), BER (XRCC1 Arg399Gln), поправка на скъсвания (XPCC1 Arg399Gln; XRCC3 Thr241Met) и нарушения на метилирането на ДНК (MTHFR C677T) при клинично здрави индивиди и при пациенти със специфични заболявания с късно начало. Провеждането на изследвания на нормалната вариантност на тези полиморфизми може да бъде полезно при по-нататъшна оценка на риска от често срещани заболявания с късно начало и за индивидуализация на терапии.

43. Chelenkova P, Petkova R, Chamova T, Zheliazkova-Glaveeva S, Tournev I, Chakarov St. Carriership of 'pro-apoptotic' and 'damage-sustaining' alleles of genes coding for proteins functioning in DNA repair may increase the risk for major vascular incidents by destabilising the endothelial wall. Първа национална конференция по биотехнология, 17-18 октомври 2014, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, София, България. Направление "Биотехнологии и здраве". Постерна сесия, НВТН 20, стр. 62.

Челенкова П, Петкова Р, Чамова Т, Желязкова С, Търнев И, **Чакъргов Ст.** Носителството на про-апоптотични алели и алели, свързани с по-ниска ефективност на поправката на ДНК на гени, кодиращи белтъци, които участват в поправката на ДНК може да е свързано с по-висок риск от сериозни съдови инциденти чрез дестабилизация на ендотелната бариера. Първа национална конференция по биотехнология, 17-18 октомври 2014, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, София, България. Направление "Биотехнологии и здраве". Постерна сесия, НВТН 20.

Клетките и тъканите в еукариотните организми са подложени ежедневно на високи нива на генотоксичен стрес. Обикновено, уврежданията в ДНК се поправят бързо и ефективно. Клетки, които са били остро увредени до степен, в която уврежданията се оценяват като твърде обширни, за да могат да бъдат поправени преди следващия цикъл на репликация и/или са натрупали постепенно увреждания над определен критичен праг обикновено се насочват към програмирана клетъчна смърт. Атеросклерозата е един от основните рискови фактори за възникване на сърдечно-съдови и мозъчно-съдови инциденти. Острото възникване на нарушения в целостта на ендотелната бариера на стената на кръвоносните съдове и формирането на исхемичен участък в кръвоносен съд с голям дебит са свързани с рязко повишаване на нивата на окислителния стрес. В резултат на това се развива некроза на мястото на лезията и скокообразно повишение на нивата на увреждане на ДНК на клетките в непосредствено съседство. Възможно е специфична генетична предиспозиция, асоциирана с увеличени нива на ДНК увреждане вследствие на намален капацитет за поправка на ДНК (хетерозиготно носителство на инсерционния полиморфизъм в гена XPC и, евентуално,

Gln алелът на полиморфизма XPD Lys751Gln) самостоятелно или в комбинация с алели, придаващи повишена склонност към апоптоза (носителство на R алела на полиморфизма TP53 P72R) да повишава риска на носителите си към цереброваскуларни инциденти дори и в отсъствие на протромботични рискови фактори по механизъм на дестабилизиране на стената на големите съдове в мозъка. При тази ситуация, малки кръвоизливи в плаки в стената на съда могат да не бъдат своевременно ограничени и увеличените нива на апоптоза в стената на съда могат да стимулират тромбообразуването. Възможно е при пациентите с предходни съдови инциденти носителството на проапоптотични алели и алели, свързани с намаление на капацитета за ДНК поправка да съставлява допълнителен рисков фактор, увеличаващ риска от съдови инциденти в бъдеще, особено при пациенти с обширни атеросклеротични изменения в съдовете.

44. Chelenkova P, Petkova R, Georgieva E, **Chakarov St.** Predominance of TP53 P72R Arg alleles in mammary gland tumour samples from Bulgarian patients. Първа национална конференция по биотехнология, 17-18 октомври 2014, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски” София, България. Направление "Биотехнологии и здраве". Постерна сесия, НВТН 21.

Челенкова П, Петкова Р, Георгиева Е, **Чакъров Ст.** Статистически значимо преобладаване на Arg алелите на полиморфизма TP53 P72R в извадка от проби от тумор на млечната жлеза от български пациенти. Първа национална конференция по биотехнология, 17-18 октомври 2014, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски” София, България. Направление "Биотехнологии и здраве". Постерна сесия, НВТН 21.

Полиморфизмът TP53 P72R се среща с висока честота във всички популации, като разпределението на честотите на двете алелни форми показва разлики в различните географски региони. Двата алтернативни полиморфни варианта на p53 могат да бъдат обект на диференциално третиране в процеса на мутагенезата в хода на раковата трансформация, като TP53 локуси, съдържащи „про-репаративния“ Pro алел обикновено селективно се делетират, а локусите, съдържащи „про-апоптотичния“ Arg алел обикновено се подлагат на раково-специфична мутагенеза. Подобен механизъм е предходно описан за туморите, асоциирани с HPV (карцином на шийката на матката и сквамозен карцином на главата и шията), както и за някои несвързани с HPV тумори (недребноклетъчен карцином на белия дроб). Нашите резултати показват необичайно разпределение на Arg алела в извадка от проби от тумори на млечната жлеза от български пациенти. Специфично, честотата на Pro алела е с >20 % по-ниска от обичайното за българската популация разпределение. Възможно е при карциномите на млечната жлеза също да се извършва селективно делетиране на локусите, съдържащи Pro алел и задържане и мутагенизиране на Arg алелите, за да бъдат превърнати в тумор-специфични изоформи на TP53 в туморни клетки с Pro/Arg хетерозиготен генотип.

45. Ivanova S, **Chakarov St**, Pankov R. Quantitative evaluation of adhesion qualities of biomimetic materials. Първа национална конференция по биотехнология, 17-18 октомври 2014, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски” София, България. Направление "Молекулярни биотехнологии". Постерна сесия, MNBTН6.

Иванова С, **Чакъров Ст**, Панков Р. Количествена оценка на адхезионните качества на биомиметични биоматериали. Първа национална конференция по биотехнология, 17-18 октомври 2014, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски” София, България. Направление "Молекулярни биотехнологии". Постерна сесия, MNBTН6.

Напредъкът в областта на тъканното инженерство и регенеративната медицина доведоха, както можеше и да се очаква, до развитие на широк спектър от нови биоматериали. Най-съвременните от тях се основават на имитация на естественото микрообкръжение на клетката и обикновено се обозначават като биомиметични материали. Счита се, че те се включват адекватно в процесите на клетъчна сигнализация и стимулират адхезията, пролиферацията и диференциацията на клетките, така че да се получи пълна регенерация на тъканта. Стандартните тестове за биосъвместимост към момента имат един сериозен недостатък – те се ограничават единствено до изследвания за евентуална токсичност (цитотоксичност, сенситизация, дразнене, пирогенност, генотоксичност). Ние считаме, че провеждането на подробни предварителни проучвания на адхезивните качества на биоматериалите като допълнение към тестовете за биосъвместимост ще доведе до икономия на материали и ресурси и ще придаде по-голяма информативност на окончателната оценка.

В настоящата работа представяме набор от тестове за стандартна оценка на биосъвместимост от гледна точка на повърхностните качества на биоматериали като адхезионен субстрат. Използвахме биосензор на основа живи клетки, създаден на основа генетично модифицирана NIH/3T3 фибробластна клетъчна линия. Биосензорът стабилно експресира два химерни флуоресцентно белязани белтъци като маркери за клетъчни адхезионни контакти - mCherry-винкулин (локализиращ се във фокалните адхезивни контакти) и GFP-тензин (локализиращ се във фокалните и фибриларните адхезивни контакти). Беше изследвано формирането на фокални и фибриларни контакти в процеса на адхезия върху пет естествени белтъка от извънклетъчния матрикс (фибронектин, витронектин, ламинин от миша саркома на Engelbreth-Holm-Swarm, ламинин-521 и колаген тип I). В допълнение, беше разработен модел за промяна на клетъчната морфология при напредване на процеса на спрединг и поляризация на клетките във времето. Всички данни от микроскопските изображения бяха околичествени чрез обработка със софтуера ImageJ. Бяха съставени и използвани шест критерия за адхезивни контакти и клетъчна морфология.

Приложимостта на биосензора за оценка на адхезивни качества на биоматериал беше демонстрирана чрез изследване на два изкуствени материала - поли(диметилсилоксан)-полиакрилова киселина и поли(диметилсилоксан-*b*-винилпирилодон). Известно е, че адхезионните контакти функционират като механосензори, поради което ние считаме, че нашите резултати в допълнение подкрепят потенциалната приложимост на биосензора за изследвания на механични качества на биоматериали.

46. Arabadjiev B, Roeva I, **Chakarov St**, Pankov R. In-situ vitrification of human embryonic stem cells. Първа национална конференция по биотехнология, 17-18 октомври 2014, София, България. Направление "Молекулярни биотехнологии". Постерна сесия, MNBTH7.

Арабаджиев Б, Роева И, **Чакъров Ст**, Панков Р. In-situ витрификация на човешки ембрионални стволови клетки. Първа национална конференция по биотехнология, 17-18 октомври 2014, София, България. Направление "Молекулярни биотехнологии". Постерна сесия, MNBTH7.

Човешките ембрионални стволови клетки (чЕСК) са относително високочувствителни към условия на криопрезервация, което вероятно е следствие на това, че прозилизат от ранни човешки бластоцити, които също изискват специфични условия, за да преживеят замразяване и последващо размразяване. Стандартните технологии за криопрезервация на чЕСК, включително и тези с бавно замразяване и витрификация на колонии в суспензия в повечето случаи се характеризират с ниска

преживяемост на клетките и високи нива на диференциация. В настоящата работа описваме система за криопрезервация на чЕСК, която включва витрификация директно върху културални съдове, покрити с човешки рекомбинантен ламинин-512 с използване на диметилсулфоксид (DMSO) и етиленгликол като криопротектори. Тази технология за in-situ витрификация на чЕСК може да бъде лесно модифицирана за използване в системи, свободни от продукти от животински произход чрез смяна на средата mTeSR1, използвана в настоящия протокол, с mTeSR2, която не съдържа продукти от животински произход. Настоящата процедура дава възможност за криопрезервация на сравнително големи количества чЕСК in-situ, при което се получава висок добив жизнеспособни недиференцирани чЕСК, което дава възможност за ефективно увеличаване на скалата на култивиране.

47. Tanya Tacheva, Dimo Dimov, Pavlina Chelenkova, Rumena Petkova, Krasimir Dimov, **Stoyan Chakarov**, Tatyana Vlaykova. MMP2 -1306C>T polymorphism and the enzyme plasma levels in patients with COPD. European Respiratory Journal 2015 46: PA861. Abstracts of the 25th ERS International Congress, Amsterdam, Netherlands 26 –30 September 2015.

5-годишен импакт индекс на списанието: 8.948

Ремоделирането на бронхиалната стена е важен механизъм в патофизиологията на ХОББ, важна роля в който играе матриксната металопроотеиназа-2 (ММР-2).

Целта на настоящото изследване беше да се изясни евентуалната роля на промоторния полиморфизъм MMP2 -1306C>T като рисков фактор и като биомаркер при ХОББ. Изследвахме чрез PCR-RFLP 84 пациента с ХОББ и 71 здрави контроли и чрез ELISA оценихме плазмените нива на MMP-2 при 59 пациента с ХОББ и 20 здрави контроли.

Разпределението на генотиповете се различаваше между пациентите с ХОББ и здравите контроли ($p=0.021$ и 0.602 , съответно), но алелната честота не се различаваше значително между двете групи.

Носителите на генотипове, съдържащи вариантния алел Т (СТ+ТТ) показаха 1.64 пъти увеличен риск за развитие на ХОББ (OR (odds ratio)=1.64, 95% CI: 0.82-3.26, $p=0.164$) от индивидите-носители на генотипа СС. Този риск се оказа значителен при индивидите на възраст над 65 години (OR=4.24, 95% CI: 1.31 - 13.57, $p=0.019$). При пациентите с генотипове, съдържащи алела Т (СТ+ТТ) се наблюдаваше по-късно начало на заболяването (64.1 ± 7.1 години), отколкото при тези с генотип СС (59.7 ± 9.5 години, $p=0.045$). Плазмените нива на MMP-2 бяха леко увеличени при пациентите с ХОББ в сравнение със здравите контроли (440 ± 208 ng/ml при болните срещу 373 ± 234 ng/ml при здравите, $p=0.229$). Тази разлика се оказа статистически значима само при пациентите от женски пол (555 ± 176 ng/ml при болните срещу 354 ± 230 ng/ml при здравите, $p=0.033$), но не и при мъжете ($p=0.798$). Плазмените нива на MMP-2 при пациентите с ХОББ се повишават с напредване на възрастта, на която е диагностицирана ХОББ ($R=0.235$, $p=0.082$), което важи с по-голяма сила за жените ($R=0.730$, $p=0.040$). При пациентите с ХОББ в IV стадий нивата на MMP-2 бяха значително по-ниски, отколкото при пациентите с по-малко напреднала ХОББ (254 ± 34 ng/ml при болните срещу vs. 457 ± 210 ng/ml при здравите контроли, $p=0.039$).

Нашите резултати показват, че носителството на генотипове, съдържащи алела Т на еднонуклеотидния полиморфизъм MMP2 -1306C>T може да е свързано с повишаване на риска от развитие на ХОББ, особено в напреднала възраст, докато плазмените нива на MMP-2 по всяка вероятност не представляват надежден биомаркер за ХОББ.

48. Chelenkova P, Petkova R, Chamova T, Zheliazkova S, Tournev I, **Chakarov S.** Common variant alleles of APOE modulate the risk for cerebrovascular incidents in a gender-dependent fashion in the Bulgarian population. Първа национална конференция по реинтродукция на консервационно значими видове и младежка научна конференция „Климентови дни”, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, 19-20 ноември, 2015, София, България. Направление "Молекулярна биология и биотехнологии". Пленарен доклад, сесия II.

Челенкова П, Петкова Р, Чамова Т, Желязкова С, Търнев И, **Чакъров С.** Носителството на често срещаните вариантни алели на АРОЕ има зависещо от пола модулиращо влияние върху риска от мозъчно-съдови инциденти при българската популация Първа национална конференция по реинтродукция на консервационно значими видове и младежка научна конференция „Климентови дни”, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, 19-20 ноември, 2015, София, България. Направление "Молекулярна биология и биотехнологии". Пленарен доклад, сесия II.

Аполипопротеин е (АРОЕ) е плазмен белтък, функциониращ в преноса и транспорт на липиди, липид-разтворими витамини и холестерол. Считаната за „див тип“ полиморфна форма на АРОЕ е Е3, а най-често срещаните във всички популации вариантни форми на АРОЕ са Е2 и Е4. Носителството на Е4 се свързва с разстройства на липидния метаболизъм и увеличено отлагане на амилоид в мозъчния паренхим и мозъчните съдове, което увеличава риска от болест на Алцхаймер и церебрална амилоидна ангиопатия. Носителството на единичен АРОЕ4 алел не оказва ефект върху риска от исхемичен инсулт при жените-носителки в българската популация, но може да увеличи риска при мъжете-носителки. Хетерозиготното носителство на алела АРОЕ2 може да е свързано с намален риск от мозъчно-съдови инциденти при мъжете-носителки, но не и при жените-носителки в българската популация. Тези ефекти вероятно се дължат на модулиращо влияние на вариантните форми на АРОЕ върху нивата на тоталния и LDL холестерола и върху риска от церебрална амилоидна ангиопатия. Необходими са по-нататъшни изследвания, за да се изяснят популационно-специфичните и полово-специфичните ефекти на носителството на вариантни АРОЕ алели в българската популация.

49. Chelenkova P, Petkova R, Chamova T, Zheliazkova S, Tournev I, **Chakarov S.** Polymorphisms in genes coding for major DNA repair proteins XPC, XPD and XRCC3 may modulate the risk for cerebrovascular incidents in the Bulgarian population. Първа национална конференция по реинтродукция на консервационно значими видове и младежка научна конференция „Климентови дни”, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, 19-20 ноември, 2015, София, България. Направление "Молекулярна биология и биотехнологии". Постерна сесия, KD 24.

Челенкова П, Петкова Р, Чамова Т, Желязкова С, Търнев И, **Чакъров С.** Носителството на полиморфизми в гените за белтъци, кодиращи ключови белтъци на поправката на ДНК XPC, XPD и XRCC3 може да модифицира риска от мозъчно-съдови инциденти в българската популация. Първа национална конференция по реинтродукция на консервационно значими видове и младежка научна конференция „Климентови дни”, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, 19-20 ноември, 2015, София, България. Направление "Молекулярна биология и биотехнологии". Постерна сесия, KD 24.

Много от гените, кодиращи ключови белтъци на ДНК поправката и поддръжката на геномния интегритет съществуват в няколко полиморфни варианта в популацията. Тези полиморфни варианти обикновено са свързани с леко понижен функционален капацитет на резултантния белтък. Носителството на вариантните алели често няма

непосредствен ефект върху фенотипа, но може да е свързан с увеличаване на риска от развитие на някои мултифакторни заболявания и състояния с късно начало. Целостта на ендотелния слой на съдовата стена на големите кръвоносни съдове зависи, освен от други фактори, и от капацитета на ендотелните клетки да понася окислителен стрес. Нивата на окислителния стрес могат да нарастват с възрастта поради хипергликемия, а също така хипоперфузия и хипоксия във връзка с атеросклеротични промени субендотелно в стената на съда, както и от влошен митохондриален метаболизъм вследствие на възрастово-зависимо натрупване на увреждания в митохондриалната ДНК. Бяха изследвани в индивиди с мозъчно-съдови инциденти и здрави контроли шест полиморфизма, съответно в гени, кодираще белтъци на поправката чрез изрязване на нуклеотиди (XPC ins83, ERCC1 C8092A; XPD Lys751Gln), поправката чрез изрязване на бази (XRCC1 Arg399Gln), поправка на чрез хомоложна рекомбинация (XPCC1 Arg399Gln) и поддръжка на геномния интегритет (TP53 P72R). Носителството на вариантни алели на полиморфизмите XPC ins83, XPD Lys751Gln и XRCC1 Arg399Gln е свързано с повишаване на риска от мозъчно-съдова болест и инсулти в българските пациенти. Хомозиготното носителство на про-апоптотичния Arg алел на полиморфизма TP53 P72R може да допринесе за повишаване на риска от мозъчно-съдови инциденти при носителите на вариантни алели на полиморфизмите XPC ins83, XPD Lys751Gln и XRCC1 Arg399Gln. Необходими са допълнителни изследвания на ролята на индивидуалния капацитет за поправка на геномни увреждания в патогенезата на мозъчно-съдовата болест. Това би могло да допринесе за подобряване на ефективността на превенцията срещу инсулти.

50. Petkova R, Zhelev N, Pankov R, **Chakarov S.** The individual capacity for repair of DNA damage may be an independent factor determining the potential uses of human stem cell lines. Младежка научна конференция с международно участие "Климентови дни" - FEBS Workshop on Molecular Life Sciences Education. Биологически факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, - 16-17. 11. 2017 г.

Петкова Р, Желев Н, Панков Р, **Чакъров С.** Индивидуалният капацитет за поправка на увреждания в ДНК може да представлява независим фактор, определящ потенциалната приложимост на човешки стволесто-клетъчни линии. Младежка научна конференция с международно участие "Климентови дни" - FEBS Workshop on Molecular Life Sciences Education. Биологически факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, - 16-17. 11. 2017 г. Постерна сесия, M49.

Предимно и изключително един тип стволови клетки (хематопоетични стволови клетки) се използва рутинно в клиничната медицина за етиологично лечение на заболявания на кръвната тъкан и на метаболитни болести. Няколко други типове препарати от човешки стволови клетки в момента се изпитват клинично за потенциална приложимост в клинични приложения. Методологиите за получаване, поддръжане *in vitro* и размножаване на стволови клетки и насочената диференциация на мултипотентни и плурипотентни стволови клетки се развиха в значителна степен през последните няколко години. В тази връзка възникнаха редица проблеми на безопасността на използване на клетъчни и тъканни препарати във връзка с риска от изменения, които могат да възникнат в култивираните *in vitro* стволови клетки и получени от тях продукти и евентуалните нежелани ефекти върху реципиента. Индивидуалният капацитет за поправка на ДНК (индивидуален репаративен капацитет, ИРК) е важен фактор, определящ мащаба на геномните промени в хода на нормалното и патологичното стареене. ИРК може да варира значително между различните индивиди. Ефектите от тези различия, обаче, могат да се изявят само с напредване на възрастта или в условия на значителен генотоксичен стрес. Към момента, количеството

на информацията във връзка с ролята на вариациите в ИРК за поддържането на човешки стволоро-клетъчни линии *in vitro* е ограничено. В настоящата работа разглеждаме наличните данни за ролята на ИРК в различните типове стволоро клетки и евентуалните нежелани ефекти, които могат да произтекат от използване в клинични приложения на препарати от клетки с по-нисък от средния капацитет за поправка на увреждания в ДНК и поддръжка на геномния интегритет.