

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ**  
**ИНСТИТУТ ПО БИОРАЗНООБРАЗИЕ И ЕКОСИСТЕМНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ**

**МАРИЯ ДИМИТРОВА ТОДОРОВА**

***CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* КАТО МОДЕЛНА ИНДИКАТОРНА СИСТЕМА  
ЗА ГЕНОТОКСИЧНОСТ НА НИСКИ ДОЗИ КСЕНОБИОТИЦИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**НА ДИСЕРТАЦИЯ  
ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“**

**ПО НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ „ГЕНЕТИКА“  
ШИФЪР 01.06.06.**

**Научен ръководител:  
проф., д-р Стефка Чанкова**

**Научен консултант:  
проф., д-р Венета Капчина-Тотева**



**София, 2014 г.**

Дисертационният труд е разработен в рамките на редовна докторантура в ИГ „Мутагенеза от околната среда”, Секция „Мутагенеза от околната среда и генетична оценка на риска”, Отдел „Екосистемни изследвания, екологичен риск и консервационна биология” към Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН.

Дисертационният труд е обсъден и насочен към защита след провеждане на заседание на разширен състав на Колегиума на отдел „Екосистемни изследвания, екологичен риск и консервационна биология“ на 16 юни 2014 г., свикано със Заповед № 117 / 27.05.2014 г. на и.д. Директор на ИБЕИ.

Дисертацията съдържа 130 страници текст, 15 таблици и 18 фигури. Списъкът на цитираната литература включва 225 заглавия, от които 8 на кирилица и 217 на латиница.

Изследванията, включени в дисертационния труд, са проведени в Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН и Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 03.09.2014 г. от 11:00 часа в заседателната зала на База 1 на Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН, София, ул. „Ю. Гагарин“ № 2, на открито заседание на Научно жури (назначено със Заповед № 143/08.07.2014 г. на и.д. Директор на ИБЕИ–БАН) в състав:

1. Проф., д-р Стефка Чанкова-Петрова (ИБЕИ-БАН) – научен ръководител
2. Проф., д-р Спаска Петкова (пенсионер, катедра „Генетика“, АУ-Пловдив)
3. Проф., д-р Аглика Едрева (пенсионер, ИФРГ-БАН)
4. Доц., д-р Маргарита Топашка-Анчева (пенсионер, ИБЕИ-БАН)
5. Доц., д-р Елена Тодоровска (АБИ, ССА)

Материалите по защитата са на разположение на всички интересуващи се в библиотеката на Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН, София, ул. „Ю. Гагарин“ № 2.

## Използвани съкращения

**ДВР** (Двуверижни разкъсвания в ДНК - DSBs )

**ЕВР** (Едноверижни разкъсвания в ДНК - SSBs)

**FDR** (Fraction DNA Released – фракция ДНК, напуснала стартовете на агарозния гел)

**CFGE** (Constant Field Gel Electrophoresis – електрофореза в постоянно поле)

**MMR** (*mismatch* репарация на ДНК)

*rec*-репарация (рекомбинативна репарация на ДНК)

**СЗО** (Световна Здравна Организация)

**АКФ** (Активни Кислородни Форми, ROS)

**МДА** (Малон диалдехид)

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** (Водороден пероксид)

**TAP** (Хранителна среда Tris Acetate Phosphate – трис ацетат фосфат)

**SG** (Хранителна среда Sager-Granick)

**LD** (Lethal Dose -летална доза)

**SF** (Survival Fraction – фракция на преживяване)

**МИ** (Мутагенен Индекс - MI)

**MAC** (Maximum Acceptable Concentration – максимално допустима концентрация)

**RIEW** (Regional Inspectorate of Environment and Water – Регионална инспекция по околната среда и водите)

**DMSO** (Dimethyl sulfoxide - ДМСО)

**MNNG** (N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine)

**PM<sub>10</sub>** (Particulate Matter – фини прахови частици с размер  $\leq 10\mu\text{m}$  в диаметър)

## **I. Увод**

Огромно количество несвойствени за живите организми вещества, т. нар. ксенобиотици, се отделят в околната среда в резултат от дейността на човека. Голяма част от ксенобиотиците имат и генотоксични свойства - пряко или косвено водят до повреди в генетичния материал и възникване на различни типове мутации, включително летални. Изучаването на ДНК увреждащото действие на генотоксините във връзка с последващите краткосрочни и дългосрочни ефекти върху биотата е предмет на науката генотоксикология.

Важен аспект на генотоксикологията, който е във фокуса на изследователите от десет години насам (Uhl et al., 2003; Eggen, Segner, 2003), е разработването на високо чувствителни биоиндикаторни и биомаркерни системи за идентифициране на ниски дози биологично активни ксенобиотици и за охарактеризиране на генотоксичния/мутагенния им потенциал върху организмите. Проблемът за разработването на растителни биоиндикаторни и биомаркерни тест-системи за ранна диагностика на степента на антропогенното натоварване и оценката на екологичния риск е особено актуален в световен и национален мащаб, т.к има пряко отношение към стратегиите за опазване на биологичното разнообразие, геномът и стабилността на растителните популации (природни и селскостопански) в замърсените райони. Освен това проблемът има отношение и към Директива 2010/63/ЕС за регулиране използването на животни за експериментални научни цели в ЕС. Целта на директивата е трайното установяване на принципа на „заместване, намаляване и облекчаване“ на използването на животни в ЕС (principle of the Three Rs, to Replace, Reduce and Refine the use of animals). Според анекс 47 налице е нарастваща нужда от нови методи за целите на генотоксикологията, които да се разработят и предложат за валидиране в Референтната лаборатория на Европейския съюз за алтернативни на тестовете с животни методи (EURL ECVAM).

Едно от направленията на Седма рамкова програма на Европейския Съюз за научни изследвания, технологично развитие и демонстрационни дейности 2007-2013 е „Оценка на риска от химически вещества и алтернативни стратегии за тестване“ (анекс 6.3.3.1)

За оценка на генотоксичния и мутагенния ефект на генотоксините се използват около 25 растителни тест-системи, разработени на 10 вида растения. Въпреки това проблемът не е решен както в организационен, така и в научен план. Основните причини могат да се търсят в огромния брой генотоксини със специфичен механизъм на действие,

комплексността на молекулярните механизми на реализация на първично индуцираните повреди в трайни наследствени изменения – мутации, процесите на биотрансформация на ксенобиотиците и т.н.

На съвременния етап на познание липсва бърза, високо чувствителна и информативна за растителните организми еукариотна клетъчна и субклетъчна система за разкриване и охарактеризиране на генотоксичния и мутагенния потенциал на ниски дози ксенобиотици, индуктори на окислителен стрес.

*Chlamydomonas reinhardtii* е чудесен модел на растителната клетка и със своите характеристики отговаря на изискванията на съвременната генотоксикология за “добрите” тест-системи (Weber et al., 2000): бързи и сравнително евтини методи; добри разрешителни възможности; чувствителност; възможност за екстраполация на резултатите върху висши еукариоти.

**Нашата хипотезата е**, че на базата на щамове *Chlamydomonas reinhardtii* с различен генотип (два, с нормално функционираща ДНК-репарация и два, дефектни по два типа ДНК-репарация) е възможно да бъде разработена еукариотна биоиндикаторна и биомаркерна система за идентификация на ниски дози ксенобиотици с различен механизъм на действие.

## **II. Цел и задачи**

**Целта на настоящия дисертационен труд е** да се проучи взаимовръзката между генотипната чувствителност и стресовия отговор на щамове *Chlamydomonas reinhardtii* с оглед използването им за целите на генотоксикологията.

За постигане на така зададената цел са поставени следните **задачи**:

1. Изследване генотипната чувствителност на щамове *Chlamydomonas reinhardtii* към зеоцин и  $\text{CdCl}_2$  на базата на микробиологични методи (*in vivo*).
2. Стресов отговор към зеоцин и  $\text{CdCl}_2$  на щамове *Chlamydomonas reinhardtii*, определен на базата на биохимични маркери за окислителен стрес: вътреклетъчно съдържание на МДА,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , каротеноиди.
3. Изследване ДНК-чувствителността на щамове *Chlamydomonas reinhardtii* към зеоцин и  $\text{CdCl}_2$  на базата на количеството първично индуцирани ДВР.
4. Подбор на биоиндикаторни щамове и биомаркери за идентификация на ниски дози ксенобиотици в лабораторни условия.

5. Използване на подобраните биоиндикаторни щамове и биомаркери за оценка на генотоксичния/мутагенния потенциал на природни проби и мултифункционални биоминерални продукти за земеделието и екологията.

### **III. Материали и методи**

**Характеристика на използваните щамове:** използвани са генотипове *C. reinhardtii* с различен ДНК репаративен капацитет. Като модел за нормално функционираща репарация на ДНК са използвани 137C(+) (див тип, WT) и CW15(+) (без клетъчна стена), описани подробно в (Chankova et al., 2014). Като модел за дефектна репарация на ДНК са използвани UVS-10 (дефектен по *rec*-репарация) (Podstavkova et al., 1992) и UVS-14 (дефектен по *mismatch*-репарация) (Vlček et al., 1997).

**Условия за култивиране на *C. reinhardtii*:** колекцията от щамове се поддържа в изследователска група „Мутагенеза от околната среда” с ръководител проф., д-р Стефка Чанкова в епруветки с полегат агар на хранителна среда Sager-Granick (SG, рН 6,8-7,0) (Harris, 1989) при непрекъснато осветление  $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  и  $t = 25 \pm 3^\circ\text{C}$ . Щамовете се пресяват на всеки 20-30 дни. За експериментални цели се залагат прекултури, като клетъчният материал от една епруетка с кос агар се прехвърля в 30 ml течна хранителна среда ТАР (Harris, 1989). Култивира се 4-5 дена при гореописаните условия за получаване на добре развита клетъчна суспензия.

#### **Третиране с:**

➤ моделни генотоксини:

- зеоцин (радиомиметик, индуктор на окислителен стрес) – експозиция 1 мин.

-  $\text{CdCl}_2$  (тежък метал, индуктор на окислителен стрес) – експозиция 1, 5, 30 мин., 2 и 24 часа.

➤ Природни проби (почва, въздух и вода) от замърсени и незамърсени райони в България – експозиция 30 мин. Почвените проби са от две „горещи” точки, разположени близо до София – село Локорско и село Яна. Пробите „вода” са от две различни категории реки – II-ра категория (река Искър след Самоков) и III-та категория (река Лесновска при с. Долни Богров). Пробите „въздух” са от ж.к. Павлово и гара Яна. Всички проби са събрани през лятото и есента на 2004г.

➤ Биотрансформиран патешки тор – мултифункционален биоминерален продукт за земеделието и екологията – експозиция 72 и 96 часа.

### Използвани методи:

- Микробиологични: spot-test (тест на петната) (Harris, 1989); метод на микроколониите (Vlček, 1987); метод на макроколониите (Bryant, 1968); тест на “видимите” мутации (Шевченко, 1979), метод на селективните среди (Harris, 1989).
- Молекулярни: агарозна гел електрофореза в постоянно електрично поле (CFGE) за отчитане нивото на ДВР в ДНК (Chankova, Bryant, 2002).
- Биохимични: вътреклетъчно съдържание на МДА (Heath, Packer, 1968), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Heath, Packer, 1968) и пигменти (хлорофил *a*, *b* и каротеноиди) (Arnon, 1949).

### Анализ на резултатите:

Изчислявани параметри:

- Фракция на преживяване (Surviving Fraction) (Bryant, 1968).
- Нива на леталност LD<sub>50</sub> (Reed, Muench, 1938)
- Тест на “видимите” мутации (Шевченко, 1979) - отчитат се фенотипно промени в размера, морфологията и пигментацията на преживелите колонии; получава се информация за типа на индуцираните и реализираните генетични повреди (специфичен начин на действие на генотоксина).
- Индекс за мутагенност ИМ (Шевченко, 1979).
- Метод на селективните среди (Harris, 1989) – отчитат се стрептомицин- и канавагин-устойчиви мутантни колонии; получава се информация за потенциалната мутагенна активност на ксенобиотика да индуцира мутации в ядрения и/или хлоропластния геном на *C. reinhardtii*.
- Фракция ДНК, напуснала стартовете (FDR) – GeneSnap, GeneTools (SynGene) (Chankova, Bryant, 2002).
- Биохимични анализи - вътреклетъчно съдържание на МДА (Heath, Packer, 1968), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Heath, Packer, 1968) и пигменти (хлорофил *a*, *b* и каротеноиди) (Arnon, 1949).
- Статистическа обработка: Всички данни са средни стойности от поне три независими експеримента. Където не се виждат стандартни грешки, те са равни или по-малки от символите на графиките. Използван е Т-тестът на Стюдънт (Snedecor, Cochran, 1967) за статистическа оценка на разликите между третираните варианти и контролата; еднофакторен дисперсионен ANOVA анализ с множество сравнение по метода на Тюки (GraphPad Prism 5 software) за статистическа оценка на средните разлики

между генотиповете; двуфакторен дисперсионен ANOVA анализ с последващи тестове по метода на Бонферони (GraphPad Prism 5 software) за оценяване влиянието на факторите генотип, концентрация на генотоксина и взаимовръзката между тях върху крайния резултат.

#### **IV. Резултати и обсъждане**

1. Изследване генотипната чувствителност на щамове *C. reinhardtii* към зеоцин и CdCl<sub>2</sub> на базата на микробиологични методи (*in vivo*).

1.1. Spot-test (тест на петната) – първа стъпка в скрининга за генотоксичност; по интензивността и компактността на петната се получава предварителна информация за: наличието или отсъствието на генотоксичен ефект на изследвания ксенобиотик; диапазонът от концентрации с генотоксично действие; времето за третиране; чувствителността на генотиповете. Спот-тестът показва, че 1 минута експозиция е достатъчна за определяне на концентрациите зеоцин с генотоксично действие. Наблюдава се повишаване на генотоксичния ефект на зеоцин в зависимост от концентрацията и генотипа. Не се формират петна при изпозването на концентрации зеоцин в диапазона от 60 до 300 µg mL<sup>-1</sup> при четирите генотипове (данните не са показани). Въз основа на интензивността на петната, чувствителността на генотиповете към зеоцин се подрежда по следния начин: CW15 > UVS-10 > UVS-14 > 137C (Фиг. 1А). Не е установено генотоксично действие на CdCl<sub>2</sub> след третиране за 1, 5 и 30 минути и в четирите генотипове (данните не са показани). Генотоксичният ефект на CdCl<sub>2</sub> се разкрива след третиране за 2 часа (Фиг. 1Б). По своята чувствителност към CdCl<sub>2</sub> генотиповете се подреждат както следва: UVS-14 > UVS-10 > CW15 > 137C.

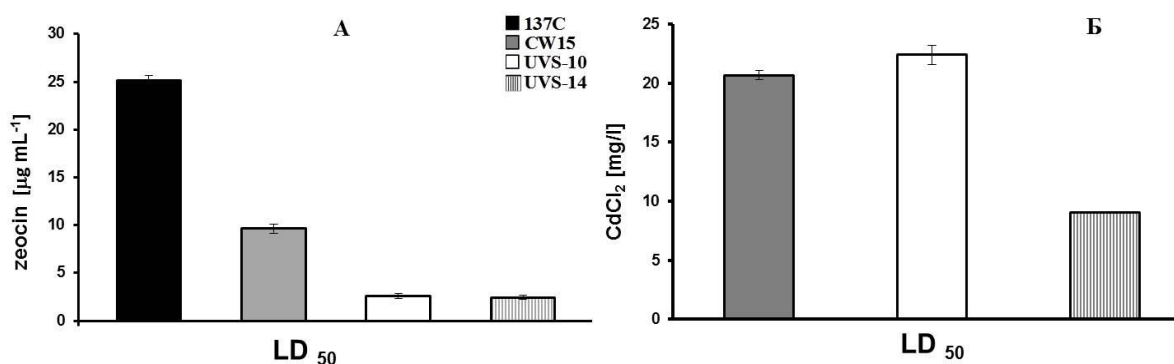
А					Б				
<i>C. reinhardtii</i> genotypes					<i>C. reinhardtii</i> genotypes				
zeocin [µg mL <sup>-1</sup> ]	CW15	UVS-10	UVS-14	137C	CdCl <sub>2</sub> [mg/l]	UVS-14	UVS-10	CW15	137C
0					0				
2					5				
6					10				
10					15				
20					30				

**Фиг. 1.** Спот-тест на генотипове *C. reinhardtii* след третиране със зеоцин (А) и CdCl<sub>2</sub> (Б).



## 1.2. Преживяване на микро/макроколонии (SF) след третиране с нарастващи концентрации зеоцин и CdCl<sub>2</sub>.

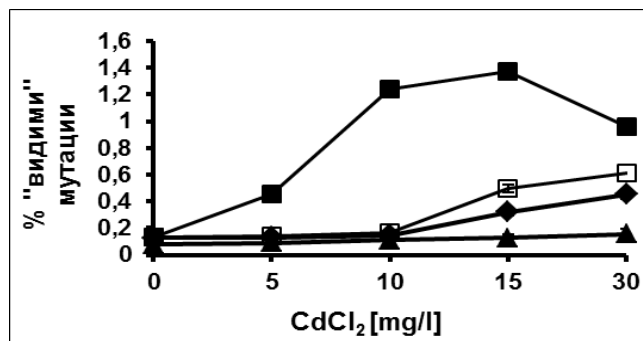
Изчислени са концентрациите зеоцин и CdCl<sub>2</sub>, които предизвикват 50% леталност (LD<sub>50</sub>) при четирите генотипове (Фиг. 2). Според стойностите на LD<sub>50</sub> по своята чувствителност към зеоцин генотиповете се подреждат както следва: UVS-10 ~ UVS-14 > CW15 > 137C (Фиг. 2А). Според стойностите на LD<sub>50</sub> по своята чувствителност към CdCl<sub>2</sub> генотиповете се подреждат по следния начин: UVS-14 > CW15 ≥ UVS-10 > 137C (Фиг. 2Б). Генотип 137C не е представен на графиката, защото при него стойността на LD<sub>50</sub> надвишава 30 mg/l CdCl<sub>2</sub> (най-високата изследвана концентрация). Двухфакторният ANOVA анализ с последващ Bonferroni тест показаха, че генотипът представлява (съставлява) 99,27% (F = 2177,68; df = 3; P < 0,0001) и 90,07% (F = 9818,01, df = 3; P < 0,0001) от общата вариация на стойностите на LD<sub>50</sub> след третиране съответно със зеоцин и CdCl<sub>2</sub>.



**Фиг. 2.** Концентрации зеоцин (А) и CdCl<sub>2</sub> (Б), които индуцират 50% леталност при генотипове *C. reinhardtii*. (А): Статистически достоверни разлики между генотиповете (P < 0,0001) с изключение на недостоверната разлика между UVS-10 и UVS-14 (P > 0,05). (Б): Статистически достоверни разлики между генотиповете (P < 0,0001) с изключение на недостоверната разлика между UVS-10 и CW15 (P > 0,05).

1.3. Тест на “видимите” мутации – използван е за разкриване на потенциалното мутагенно действие на CdCl<sub>2</sub>. Установено е, че CdCl<sub>2</sub> индуцира три типа „видими мутации” - дребни, пигменти и мозаечни, които според Шевченко (1979) могат да възникват в резултат от нарушено клетъчно делене, ядрени точкови мутации и дългоживеещи микро-хромозомни аберации. Стесняването на спектъра на индуцираните „видими“ мутации е индикация за спецификата в действието на CdCl<sub>2</sub>. Най-мутабилен е дефектният по *mismatch*-репарация генотип UVS-14. При UVS-14 е установен най-висок

процент “видими” мутации (Фиг. 3). Генотип UVS-14 проявява висока мутабилност и към други видове химични агенти (Vlcek et al., 1997).



**Фиг. 3.** Ефект на третирането с CdCl<sub>2</sub> за 2 часа върху % “видими” мутации в четири генотипове *C. reinhardtii*: 137C (▲), CW15 (◆), UVS-10 (□) и UVS-14 (■). Средни данни от три независими експеримента. Статистически достоверни разлики между 137C и UVS-14 ( $P < 0,001$ ), CW15 и UVS-14 ( $P < 0,05$ ), UVS-14 и UVS-10 ( $P < 0,05$ ).

Според изчислените стойности на МИ (Таблица 1) CdCl<sub>2</sub> няма мутагенно действие в генотиповете с нормална ДНК-репарация (137C и CW15) и има слабо мутагенно действие в генотиповете с дефектна ДНК-репарация (UVS-10 и UVS-14).

**Таблица 1.** Мутагенен индекс (МИ) на CdCl<sub>2</sub> при четири генотипове *C. reinhardtii*.

CdCl <sub>2</sub> [mg/l]	137C	CW15	UVS-10	UVS-14
5	0.41	1.04	1.59	2.36
10	0.64	1.38	2.15	8.17
15	0.86	1.68	2.67	9.22
30	1.18	2.38	3.54	6.13

За да се получи допълнителна информация относно способността на CdCl<sub>2</sub> да индуцира мутации в два хлоропластни гена (*rps12* и *rnnS*) и/или два ядрени локуса (SR1, група на скачване IX и CAN1, група на скачване VII) е използван метода на селективните среди. Резултатите показаха, че CdCl<sub>2</sub> не индуцира мутации в хлоропластната ДНК (стрептомицин-резистентни мутации), а само ядрени генни мутации (канаванин-резистентни мутации). Висока честота на възникване на ядрени генни мутации е наблюдавана при дефектните по ДНК-репарация генотипове UVS-10 и UVS-14, като при дефектния по *mismatch*-репарация генотип UVS-14 тя е най-висока (Таблица 2). Например при 15 mg/l CdCl<sub>2</sub> честотата на възникване на ядрени генни мутации в генотип UVS-14 е около 10 пъти по-голяма от тази при генотип UVS-10. Следователно, може да се направи извод, че

генотип UVS-14 е най-чувствителен за разкриване на мутации в ядрения CAN1 локус, група на свързване VII.

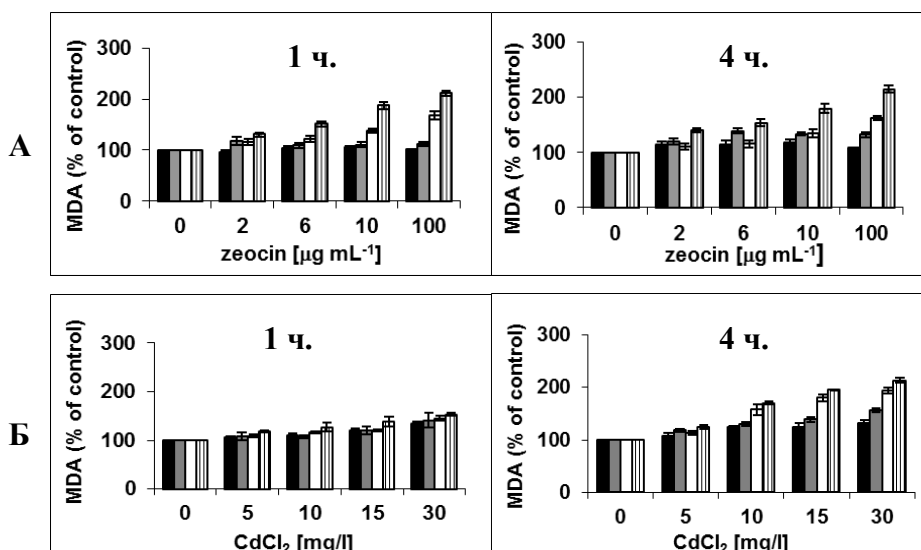
**Таблица 2.** Честота на възникване на ядрени генни мутации (канаванин-резистенти) след третиране с CdCl<sub>2</sub> в четири генотипове *C. reinhardtii*. Статистически достоверни разлики между генотип UVS-14 и останалите генотипове (P < 0,001).

CdCl <sub>2</sub> [mg/l]	137C	CW15	UVS-10	UVS-14
5	0	0	0	0
10	22 ± 0.02	90 ± 0.01	130x10 <sup>-5</sup> ± 0.03	200x10 <sup>-5</sup> ± 0.02
15	35 ± 0.01	1250 ± 0.02	1800x10 <sup>-5</sup> ± 0.02	16000x10 <sup>-5</sup> ± 0.01
30	32 ± 0.02	120 ± 0.03	100x10 <sup>-5</sup> ± 0.03	700x10 <sup>-5</sup> ± 0.03

2. Стресов отговор към зеоцин и CdCl<sub>2</sub> на щамове *C. reinhardtii*, определен на базата на биохимични маркери за окислителен стрес: съдържание на МДА, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, каротеноиди.

Измерено е вътреклетъчното съдържание на МДА, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и каротеноиди на 1<sup>-ия</sup> и 4<sup>-ия</sup> час след третирането с различни концентрации зеоцин (експозиция 1 мин) и CdCl<sub>2</sub> (експозиция 2 часа).

**Съдържание на МДА.** Третирането със зеоцин и CdCl<sub>2</sub> води до по-високо съдържание на МДА в дефектните по ДНК репарация генотипове UVS-14 и UVS-10 и в генотипа без клетъчна стена CW15 в сравнение с дивия генотип 137C (Фиг. 4). Най-силно изразен стресов отговор (най-високо съдържание на МДА) е установено в UVS-14 (P < 0,01) след третиране и с двата генотоксина. Следователно зеоцин и CdCl<sub>2</sub> могат да индуцират най-силен окислителен стрес в дефектния по *mismatch*-репарация генотип UVS-14. Генотипът, концентрацията и взаимовръзката между тях са от изключително значение върху съдържание на МДА (P < 0,0001) (Таблица 3, 4).



**Фиг. 4.** Вътреклетъчно съдържание на МДА, измерено на 1<sup>-ия</sup> час и 4<sup>-ия</sup> час след третиране със зеоцин (А) и CdCl<sub>2</sub> (Б) в генотипове *C. reinhardtii* 137С (■), CW15 (▣), UVS-10 (□) and UVS-14 (▨). Средни данни от три независими експеримента. (А): Статистически достоверни разлики на 1<sup>-ия</sup> час: UVS-14 и CW15 (P < 0,05), UVS-14 и 137С (P < 0,01). Статистически достоверни разлики на 4<sup>-ия</sup> час: UVS-14 и 137С (P < 0,01). Няма статистически достоверни разлики между съдържанието на МДА, измерено на 1<sup>-ия</sup> и 4<sup>-ия</sup> час при всички генотипове (P > 0,05). (Б): Статистически достоверни разлики на 1<sup>-ия</sup> час: UVS-14 и CW15 (P < 0,01), UVS-14 и 137С (P < 0,01), UVS-14 и UVS-10 (P < 0,05). Статистически достоверни разлики на 4<sup>-ия</sup> час: UVS-14 и 137С (P < 0,01), UVS-10 и 137С (P < 0,05), UVS-14 и CW15 (P < 0,05). Статистически достоверни разлики между съдържанието на МДА, измерено на 1<sup>-ия</sup> и 4<sup>-ия</sup> час има при генотипове UVS-14 (P < 0,05) и UVS-10 (P < 0,05).

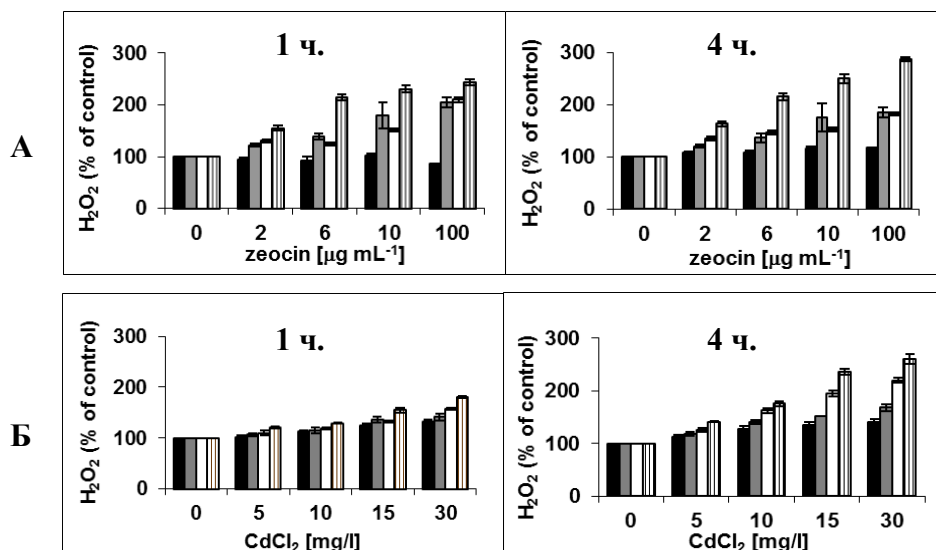
**Таблица 3.** Двухфакторен ANOVA анализ с последващ Bonferroni тест на резултатите след третиране със зеоцин.

Фактор	df	МДА (%)		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%)		Каротеноиди (%)	
		F	P	F	P	F	P
генотип	7	85.13	0.000	117.72	0.000	8.28	0.000
концентрация зеоцин	4	122.93	0.000	175.54	0.000	19.94	0.000
генотип + концентрация зеоцин	28	13.23	0.000	13.75	0.000	4.00	0.000

**Таблица 4.** Двухфакторен ANOVA анализ с последващ Bonferroni тест на резултатите след третиране с CdCl<sub>2</sub>.

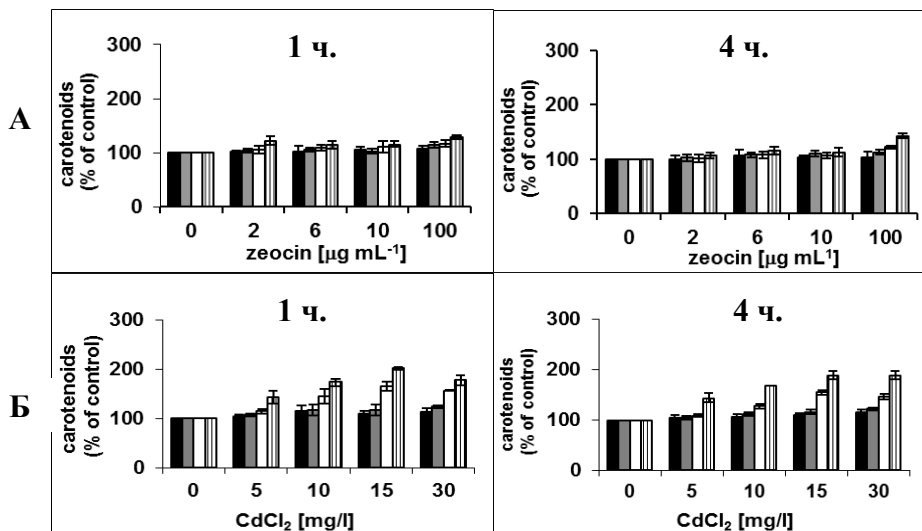
Фактор	df	МДА (%)		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%)		Каротеноиди (%)	
		F	P	F	P	F	P
генотип	7	60.58	0.000	156.71	0.000	59.21	0.000
концентрация CdCl <sub>2</sub>	4	185.53	0.000	421.14	0.000	76.22	0.000
генотип + концентрация CdCl <sub>2</sub>	28	8.32	0.000	19.92	0.000	5.59	0.000

**Съдържание на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Повишено съдържание на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> е измерено в дефектните по ДНК репарация генотипове (UVS-14 и UVS-10) и в генотип CW15 (без клетъчна стена) (Фиг. 5). Най-висока индукция на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> е установена в дефектния по *mismatch*-репарация генотип UVS-14 (P < 0,01) след третиране и с двата генотоксина (Фиг. 5). Генотипът, концентрацията и взаимовръзката между тях са от изключително значение върху съдържание на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (P < 0,0001) (Таблица 3, 4).



**Фиг. 5.** Вътреклетъчно съдържание на  $H_2O_2$ , измерено на 1<sup>-ия</sup> час и 4<sup>-ия</sup> час след третиране със зеоцин (А) и  $CdCl_2$  (Б) в генотипове *C. reinhardtii* 137C (■), CW15 (▣), UVS-10 (□) and UVS-14 (▨). Средни данни от три независими експеримента. (А): Статистически достоверни разлики на 1<sup>-ия</sup> час: UVS-14 и 137C ( $P < 0,01$ ). Статистически достоверни разлики на 4<sup>-ия</sup> час: UVS-14 и 137C ( $P < 0,01$ ), UVS-14 и CW15 ( $P < 0,05$ ), UVS-14 и UVS-10 ( $P < 0,05$ ). Няма статистически достоверни разлики между съдържанието на  $H_2O_2$ , измерено на 1<sup>-ия</sup> и 4<sup>-ия</sup> час при всички щамове ( $P > 0,05$ ). (Б): Статистически достоверни разлики на 1<sup>-ия</sup> час: UVS-14 и CW15 ( $P < 0,05$ ), UVS-14 и 137C ( $P < 0,01$ ). Статистически достоверни разлики на 4<sup>-ия</sup> час: UVS-14 и 137C ( $P < 0,01$ ), UVS-14 и CW15 ( $P < 0,05$ ). Статистически достоверни разлики между съдържанието на  $H_2O_2$ , измерено на 1<sup>-ия</sup> и 4<sup>-ия</sup> час има при генотипове UVS-14 ( $P < 0,05$ ) и UVS-10 ( $P < 0,05$ ).

**Съдържание на каротеноиди.** Единствено третирането с високата концентрация  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  зеоцин води до статистически достоверно повишаване на съдържанието на каротеноиди в дефектния по *mismatch*-репарация генотип UVS-14 на 1<sup>-ия</sup> ( $P < 0,01$ ) и на 4<sup>-ия</sup> ( $P < 0,0001$ ) час след третирането (Фиг. 6А). Третирането с  $CdCl_2$  води до по-голямо повишаване на количеството на каротеноиди, като най-силно е изразено отново в генотип UVS-14 ( $P < 0,0001$ ) (Фиг. 6Б). Каротеноидите са част от неензимната антиоксидантна защита на клетките и тяхното повишаване може да се разглежда като механизъм за преодоляване на  $CdCl_2$ -индуцираните окислителни повреди, които се опитва да компенсира дефекта в *mismatch*-репарацията в генотип UVS-14. Генотипът, концентрацията и взаимовръзката между тях са от изключително значение върху съдържанието на каротеноиди ( $P < 0,0001$ ) (Таблица 3, 4).

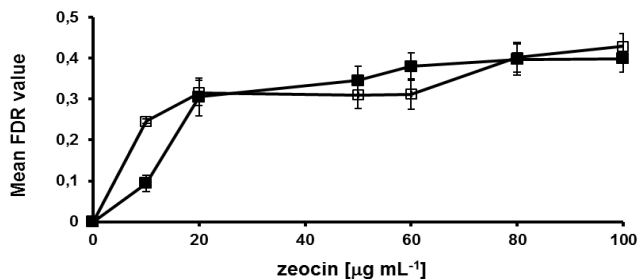


**Фиг. 6.** Вътреклетъчно съдържание на каротеноиди, измерено на 1<sup>-ия</sup> час и 4<sup>-ия</sup> час след третиране със зеоцин (А) и CdCl<sub>2</sub> (Б) в генотипове *C. reinhardtii* 137C (■), CW15 (▣), UVS-10 (□) and UVS-14 (▨). Средни данни от три независими експеримента. (А): Няма статистически достоверни разлики между съдържанието на каротеноиди, измерено на 1<sup>-ия</sup> и 4<sup>-ия</sup> час при всички генотипове ( $P > 0.05$ ). (Б): Статистически достоверни разлики на 1<sup>-ия</sup> и 4<sup>-ия</sup> час между генотипове UVS-14 и 137C ( $P < 0,05$ ) и между CW15 и UVS-14 ( $P < 0,05$ ).

### 3. ДНК-чувствителност на щамове *C. reinhardtii* към зеоцин и CdCl<sub>2</sub> на базата на нивото на първично индуцираните ДВР.

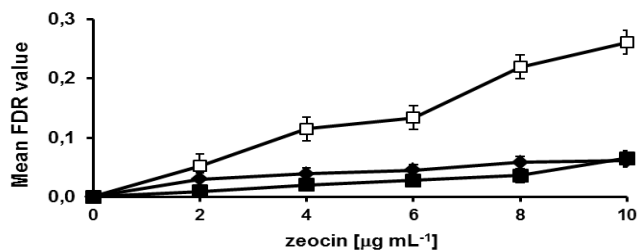
#### 3.1. Определяне нивото на зеоцин-индуцираните ДВР.

Двата дефектни по репарация генотипове UVS-10 и UVS-14 са третирани с широк диапазон от концентрации зеоцин (10 - 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Данните за CW15 and 137C са получени от предходни наши изследвания (съответно Chankova et al., 2007; Dimova et al., 2009). Установена е дозово-зависима индукция на ДВР до 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  зеоцин (Фиг. 7), след което се наблюдава плато в нивото на ДВР, подобно на генотиповете с нормална ДНК репарация. Зеоцин (10 - 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) индуцира приблизително еднакви нива на ДВР ( $P > 0,05$ ) в дефектните по ДНК-репарация генотипове и генотипа без клетъчна стена, които са около 2-пъти по-високи от нивата на ДВР, индуцирани в дивия генотип ( $P < 0,0001$ ). Следователно генотиповете UVS-10, UVS-14 и CW15 биха могли да се обединят в група с висока ДНК – чувствителност към изследвания диапазон от концентрации зеоцин. Двухфакторният ANOVA анализ с последващ Bonferroni тест показаха, че нивото на зеоцин-индуцираните ДВР-ДНК се влияе значително от генотипа ( $F = 58,44$ ;  $df = 3$ ;  $P < 0,0001$ ), концентрацията ( $F = 63,09$ ;  $df = 8$ ;  $P < 0,0001$ ) и взаимодействието между тях ( $F = 3,43$ ;  $df=24$ ;  $P < 0,0001$ ).



**Фиг. 7.** Индукция на ДВР в ДНК след третиране със зеоцин (10 - 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), измерена като фракция ДНК, напуснала стартовете на агарозния гел (FDR); генотипове *C. reinhardtii*: UVS-14 (■) and UVS-10 (□). Статистически достоверни разлики между генотиповете при 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$  зеоцин ( $P < 0,0001$ ).

Най-високо количество ДВР в диапазона на ниските концентрации зеоцин (2 - 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) се индуцира при дефектния по *rec*-репарация генотип UVS-10 (4,0 – 7,3 пъти повече над нивото в генотипове UVS-14 и CW15). Другият дефектен по ДНК-репарация генотип UVS-14 (дефектен по *mismatch*-репарация) показва приблизително еднаква ДНК – чувствителност с тази на генотипа без клетъчна стена CW15 ( $P > 0,05$ ). Двухфакторният ANOVA анализ с последващ Bonferroni тест показаха, че нивото на зеоцин-индуцираните ДВР се влияе значително от генотипът ( $F = 54,22$ ;  $df=3$ ;  $P < 0,0001$ ), концентрацията ( $F = 18,76$ ;  $df=5$ ;  $P < 0,0001$ ) и взаимовръзката между тях ( $F = 5,62$ ;  $df = 10$ ;  $P < 0,0001$ ).

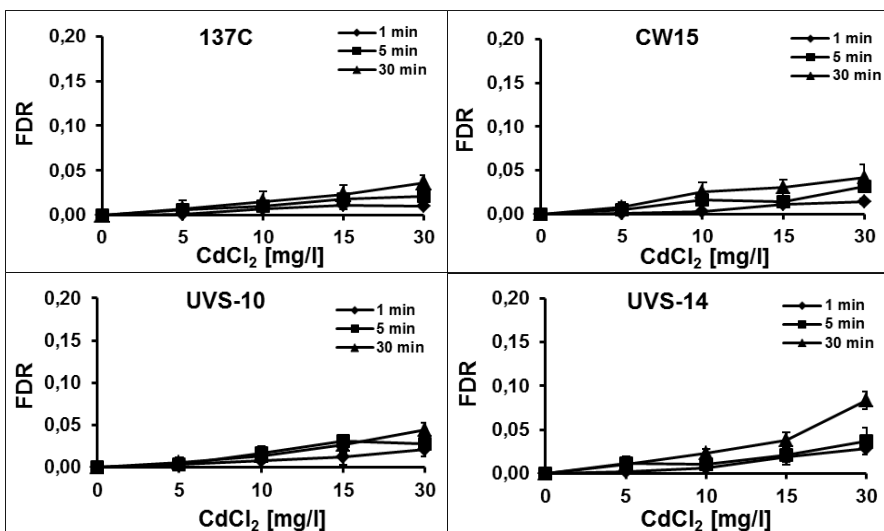


**Фиг. 8** Индукция на ДВР в ДНК от зеоцин (2 - 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), измерена като фракция ДНК, напуснала стартовете на агарозния гел (FDR); генотипове *C. reinhardtii*: UVS-14 (■), UVS-10 (□) и CW15 (◆). Статистически достоверна разлика между генотипове UVS-10 и UVS-14 ( $P < 0,01$ ) и между генотипове UVS-10 и CW15 ( $P < 0,05$ ).

### 3.2. Определяне нивото на $\text{CdCl}_2$ – индуцираните ДВР.

Установено е, че краткотрайното въздействие с  $\text{CdCl}_2$  за 1, 5, и 30 минути не индуцира статистически достоверно по-високо ниво на ДВР в сравнение с контролата ( $P > 0,05$ ) (Фиг. 9). Единствено при генотип UVS-14 третирането с 30mg/l  $\text{CdCl}_2$  за 30 минути води

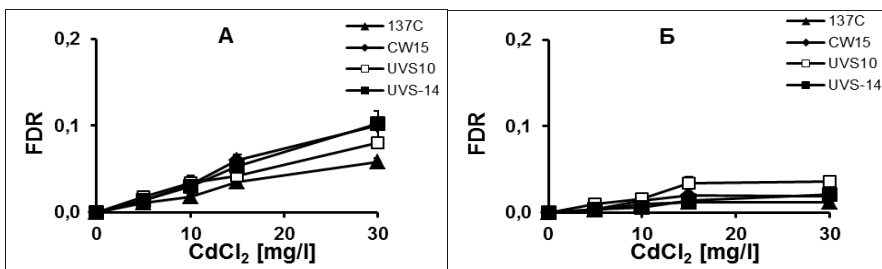
до статистическо достоверно повишаване на нивото на ДВР (около 1,9 пъти над нивото в контролата ( $P < 0,05$ )).



**Фиг. 9.** CdCl<sub>2</sub>-индуцирани ДВР в четири генотипове *C. reinhardtii* след третиране за 1, 5 и 30 минути.

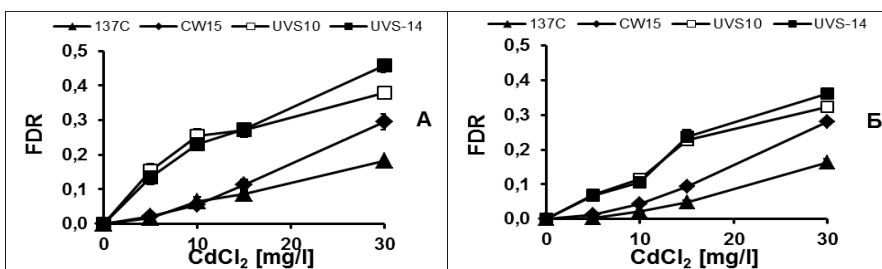
При експозиция 2 часа на лед (за предотвратяване на ДНК-репарацията) високите концентрации CdCl<sub>2</sub> (15 и 30 mg/l) индуцират статистически достоверно по-високо количество ДВР, в сравнение с контролата ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ) при всички генотипове (фиг. 10А). Когато третирането с CdCl<sub>2</sub> се осъществява на стайна температура (позволява извършване на ДНК-репарация) няма статистически достоверно повишаване на нивото на индуцираните ДВР в третираните варианти в сравнение с контролните ( $P > 0,05$ ) (фиг. 10Б). Разликите в нивата на ДВР във вариантите „без” и „със” ДНК-репарация са статистически доказани ( $P < 0,05$ ). Може да се предположи, че ДВР индуцирани при експозиция 2 часа могат да се репарират в голяма степен (слабо ДНК-увреждащо действие). Няма статистически доказана разлика между генотиповете ( $P > 0,05$ ).





**Фиг. 10** CdCl<sub>2</sub>-индуцирани ДВР в четири генотипове *C. reinhardtii* след третиране за 2 часа без (А) и със (Б) репарация, измерена като фракция ДНК, напуснала стартовете на агарозния гел (FDR).

Установено е, че дълготрайното въздействие с CdCl<sub>2</sub> за 24 часа (Фиг. 11) води до ясно изразена дозово-зависима индукция на ДВР и при четирите генотипове, третирани в условия без (А) и в условия със ДНК-репарация (Б). Въз основа на измереното количество индуцирани ДВР генотиповете оформят две групи: с висока ДНК-чувствителност към CdCl<sub>2</sub> – дефектните по *rec*- и *mismatch*-репарация генотипове, и с ниска ДНК-чувствителност към CdCl<sub>2</sub> – дивият генотип и генотипът без клетъчна стена. Индуцираните ДВР при дълготрайно третиране с CdCl<sub>2</sub> се репарират частично. Няма статистически доказани разлики между количествата ДВР сравнявайки вариантите „без“ и „с“ репарация ( $P > 0,05$ ). Следователно може да се предположи, че ДВР, индуцирани при дълготрайно третиране (24 часа) с CdCl<sub>2</sub> не са толкова добре репарирани (силно ДНК-увреждащо действие) в сравнение с ДВР, индуцирани при третиране за 2 часа.



**Фиг. 11** CdCl<sub>2</sub>-индуцирани ДВР в четири генотипове *C. reinhardtii* след третиране за 24 часа без (А) и със (Б) репарация, измерена като фракция ДНК, напуснала стартовете на агарозния гел (FDR). Статистически достоверни разлики между генотипове 137С и UVS-10 ( $P < 0,01$ ), 137С и UVS-14 ( $P < 0,01$ ), CW15 и UVS-14 ( $P < 0,05$ ), CW15 и UVS-10 ( $P < 0,05$ ) при вариантите без репарация (А) и между генотипове 137С и UVS-10 ( $P < 0,01$ ), 137С и UVS-14 ( $P < 0,01$ ), CW15 и UVS-14 ( $P < 0,05$ ), CW15 и UVS-10 ( $P < 0,05$ ) при вариантите с репарация (Б).

4. Подбор на биоиндикаторни щамове и биомаркери за идентификация на ниски дози ксенобиотици в лабораторни условия.

Според чувствителността си към зеоцин, определена на базата на няколко метода, изследваните генотипове се подреждат както следва:

- ❖ Спот-тест: CW15 > UVS-10 > UVS-14 > 137C;
- ❖ Метод на микроколониите (LD<sub>50</sub>): UVS-10 ~ UVS-14 > CW15 > 137C;
- ❖ Ниво на първично индуцираните ДБР (10- 300 µg mL<sup>-1</sup> зеоцин): UVS-10 ~ UVS-14 ~ CW15 > 137C;
- ❖ Ниво на първично индуцираните ДБР (2 - 10 µg mL<sup>-1</sup> зеоцин): UVS-10 > UVS-14 ~ CW15.

Резултатите показват, че има значително съответствие по критерия чувствителност на генотиповете към зеоцин и по трите използвани метода. Най-устойчив към зеоцин е дивият генотип 137C, а най-голяма чувствителност проявява генотип UVS-10 (дефектен по *rec*-репарация).

Липсата на клетъчна стена и отсъствието на *rec*- и *mismatch*-репарация са най-вероятните механизми, свързани с по-високата чувствителност към зеоцин на генотипа без клетъчна стена (CW15) и на генотиповете с дефектна ДНК репарация (UVS-14 и UVS-10). Нашите резултати са в добра корелация с изследванията на Liu и сътр., (2011), където ненормално функциониращ друг тип репарация на ДНК - базово-ексцизионната, резултат от дефектна β ДНК полимераза (pol β), води до чувствителност на миши ембрионални фибробласти (MEFs) към блеомицин, проявяваща се в повишени нива на АКФ, ЕВР и хромозомни разкъсвания.

Интересен е фактът, че дефектният по *rec*-репарация генотип UVS-10, в диапазона на много ниските концентрации (2 - 10 µg mL<sup>-1</sup>) зеоцин, проявява по-висока ДНК-чувствителност, определена като най-голямо количество индуцирани ДБР, в сравнение с дефектния по *mismatch*-репарация UVS-14. Хомоложната рекомбинативна репарация на ДНК е много важна за репарирание на ДБР в ДНК на *C. reinhardtii* (Vlcek et al., 2008). Този факт би могъл да обясни високата чувствителност към зеоцин на дефектния по *rec*-репарация UVS-10, определена на базата на ниското клетъчно преживяване и високото ниво на първично индуцираните ДБР. Следователно би могло да се предположи, че генотип UVS-10 е много подходящ модел за разкриване на ниски концентрации ДНК-увреждащи вещества (генотоксини). Използвайки метода на микроколониите, Miadoková и сътр. (1994, 1995) установяват висока чувствителност на дефектния по *rec*-репарация

генотип UVS-10 и към други химични вещества (MNNG и пет естери на фенилкарбамидната киселина). Авторите предполагат, че ген, отговорен за рекомбинативната репарация, има важна роля за репарацията на повреди в ДНК, причинени от MNNG и естерите на фенилкарбамидната киселина. Генотип UVS-10 проявява висока чувствителност и към X-лъчи, определена на базата на ниско клетъчно преживяване и повишена честота на стрептомицин-устойчиви мутации (Slivkova et al., 1998). Тези резултати показват ролята на рекомбинативната ДНК-репарация за отстраняването на ДНК-повреди, причинени от X-лъчи.

От друга страна, Guénoilé и сътр., (2013) предполагат, че третирането на дрожди със зеоцин за 48 часа индуцира по-скоро апуринови/апиримидинови (AP) сайтове отколкото разкъсвания в ДНК. Нашите данни предоставят допълнителна информация за спецификата в механизма на действие на зеоцин в зависимост от експерименталния дизайн – дозово-зависимо повишаване на нивото на ДБР в *S. reinhardtii* при кратка експозиция от 1 минута и индуциране на повреди за отстраняването на които е необходима *rec* - и *mismatch* – репарация. Трябва да се отчете и ролята на използваните моделни обекти (едноклетъчни зелени водорасли и дрожди) върху крайния биологичен ефект.

Според получените от нас резултати по своята чувствителност към CdCl<sub>2</sub>, определена на базата на няколко метода, генотиповете се подреждат в следния ред:

- ❖ Спот-тест: UVS-14 > UVS-10 > CW15 > 137C;
- ❖ Метод на макроколониите (LD<sub>50</sub>): UVS-14 > CW15 ≥ UVS-10 > 137C;
- ❖ Ниво на първично индуцираните ДБР (експозиция 24 часа): UVS-14 ~ UVS-10 > CW15 ≥ 137C

Установено е пълно съответствие по критерия чувствителност към CdCl<sub>2</sub> и по трите използвани метода при генотипове 137C (WT) и UVS-14 (дефектен по *mismatch*-репарация). Следователно най-устойчив към CdCl<sub>2</sub> е дивият генотип 137C. При нашите експериментални условия дивият генотип проявява винаги ниска чувствителност, независимо от типа на използвания генотоксин (зеоцин или CdCl<sub>2</sub>). Най-чувствителен към CdCl<sub>2</sub> е дефектният по *mismatch*-репарация генотип UVS-14.

Има противоречиви данни в литературата относно чувствителността на MMR-дефектни и MMR-нормални клетки на бозайници към различни генотоксини (Jacob et al., 2001; Sonneveld et al., 2001; Franchitto et al., 2003; Stojic et al., 2004). Във всички тези

изследвания разликите в клетъчното преживяване на MMR-дефектните и MMR-нормалните клетки са около 2 пъти. Подобно на тези изследвания ние установихме, че разликите в клетъчното преживяване на MMR - дефектния генотип UVS-14 и MMR-нормалния генотип 137C, след третиране с ниски концентрации зеоцин, са около 2 пъти ( $P < 0,0001$ ). Около 2 пъти ( $P < 0,0001$ ) е разликата в преживяването на MMR - дефектния генотип UVS-14 и MMR – нормалния генотип 137C след третиране и с другия генотоксин -  $CdCl_2$ . От друга страна MMR-дефектния генотип UVS-14 и генотипът с дефектна *rec*-репарация UVS-10 (MMR-нормален) показват приблизително еднаква чувствителност към ниски концентрации зеоцин (базирана на данните от спот-теста и стойностите на  $LD_{50}$ ) и към  $CdCl_2$  (въз основа на спот-теста и нивото на индуцираните ДВР). Следователно може да се предположи, че зеоцин и  $CdCl_2$  индуцират повреди в ДНК на *C. reinhardtii* за поправянето на които е нужна *rec*- и *mismatch*-репарация.

Нашите резултати показват съществената роля на генотипа при определяне на силата на стресовия отговор към двата генотоксина. Независимо от типа на генотоксина (зеоцин или  $CdCl_2$ ) стресовият отговор на генотиповете, измерен чрез биохимични маркери, е аналогичен:

❖ съдържание на МДА:

зеоцин: UVS-14 > UVS-10 > CW15 > 137C

$CdCl_2$ : UVS-14 > UVS-10 > CW15 > 137C

❖ съдържание на  $H_2O_2$ :

зеоцин: UVS-14 > UVS-10  $\geq$  CW15 > 137C

$CdCl_2$ : UVS-14 > UVS-10 > CW15 > 137C

❖ съдържание на каротеноиди:

зеоцин: UVS-14 > UVS-10  $\geq$  CW15  $\geq$  137C

$CdCl_2$  : UVS-14 > UVS-10 > CW15  $\geq$  137C

Установено е пълно съответствие (и по трите биохимични маркери) в стресовия отговор към окислителен стрес, предизвикан от зеоцин и  $CdCl_2$  в четирите генотипове. Най-слаб стресов отговор и към зеоцин и към кадмий проявява дивият генотип 137C. Най-силен стресов отговор към изследваните генотоксини се наблюдава при дефектния по *mismatch*-репарация UVS-14. Следователно зеоцин и  $CdCl_2$  могат да се разглеждат като индуктори на окислителен стрес, най-силно изразен в дефектния по *mismatch*-репарация

генотип UVS-14. Най-високото съдържание на МДА (силно токсична молекула с генотоксичен потенциал) в генотип UVS-14, след третиране с  $\text{CdCl}_2$ , е вероятна причина за наблюдаваната при този генотип най-голяма мутабилност към  $\text{CdCl}_2$  (най-висок процент “видими” мутации и най-голяма честота на възникване на ядрени генни мутации). Голямата мутабилност може да се свърже и с високо ниво на  $\text{H}_2\text{O}_2$ , измерено в генотип UVS-14.  $\text{H}_2\text{O}_2$  е представителна АКФ и като такава може да предизвика окислителни атаки върху ДНК, водещи до редица повреди в ДНК. Например, промени в нуклеотидите в едната верига могат да доведат до несъответствия (*mismatches*) в нуклеотидите в другата верига и ако повредите не се отстранят (чрез *mismatch*-репарация) се получават последващи мутации (Sharma et al., 2012). Следователно, неспособността на генотип UVS-14 да се справи с този тип ДНК-повреди, защото е дефектен по *mismatch*-репарация, има за резултат неговата висока мутабилност към  $\text{CdCl}_2$  (индуктор на окислителен стрес). Нашите резултати за повишени нива на МДА и  $\text{H}_2\text{O}_2$  в *Chlamydomonas reinhardtii* след третиране със зеоцин, потвърждават потенциала на зеоцин да индуцира окислителен стрес във фотосинтезиращи еукариоти (Chankova et al., 2013). Получените резултати са информативни относно ролята на системата на *mismatch*-репарацията в отговора на растителната клетка към окислителен стрес, индуциран от зеоцин и  $\text{CdCl}_2$ .

Дефекти в компонентите на MMR (например в ген *Msh2*) водят до обща геномна нестабилност (Fritzell et al 1997; Yan et al 2001). Тези изследвания са в съгласие с нашите резултати, където дефектният по *mismatch*-репарация генотип UVS-14 показва най-силен стресов отговор към двата изследвани генотоксина ( $\text{CdCl}_2$  и зеоцин). В генотип UVS-14 може да се очаква “грешна” хомоложна рекомбинативна репарация на ДНК, защото един от контролиращите точността ѝ механизми, а именно *mismatch*-репарацията, е дефектен. Наслагването на тези негативни ефекти са възможна причина за установената най-ниска стойност на  $\text{LD}_{50}$  и най-висока мутабилност след третиране с кадмий при генотип UVS-14. Ключовата роля на MMR в поддържането на геномната стабилност (Filipič, 2012) е установена и в изследванията на Piao и сътр. (2014). Установено е, че в мишки с дефектна MMR, формирането на чревни тумори след прием на  $\text{KBrO}_3$  (окисляващ агент, индуциращ 8-охоG в ДНК) нараства в много по-голяма степен в сравнение с мишки с нормална MMR. Според авторите, MMR има значителна роля в предотвратяването на чревната туморогенеза, индуцирана от окислителен стрес в мишки.

Получените резултати от дисертационния труд имат теоретичен принос относно спецификата в действието на зеоцин и кадмий и изясняване на механизмите, определящи чувствителността на фотосинтезиращите еукариоти към различни индуктори на окислителен стрес. Високата чувствителност към зеоцин и  $\text{CdCl}_2$  на генотиповете с дефектна ДНК – репарация е показател, че зеоцин и  $\text{CdCl}_2$  предизвикват два типа повреди в ДНК: повреди, за отстраняването на които е нужна нормално функционираща *rec*-репарацията, и повреди, за отстраняването на които е нужна нормално функционираща *mismatch* –репарация.

Освен теоретичен принос, резултатите, представени в настоящата дисертация, имат и приложно значение за генотоксикологията в лабораторни условия. Установената при нашите изследвания най-слаба чувствителност на дивия генотип 137C към изследваните генотоксини ни дава основание да го препоръчаме за разкриване наличието на биоактивни субстанции в проби с неизвестно съдържание. Високата чувствителност към ДНК-увреждащи ксенобиотици на генотиповете с дефектна ДНК-репарация (UVS-10 - дефектен по *rec*-репарация и UVS-14 - дефектен по *mismatch*-репарация) ги прави неподходящи за първоначално разкриване на биоактивни субстанции в проби с неизвестно съдържание, поради голямата вероятност от наблюдаване на летален изход. Те биха могли да се използват за получаване на допълнителна първична информация относно механизма на действие на биологично активните субстанции в пробите. Нашите резултати показваха, че приложените методи (микробиологични - спот-тест, метод на микро- /макроколонии, молекулярни - индукция на ДВР, биохимични - съдържание на МДА,  $\text{H}_2\text{O}_2$  и каротеноиди) за сравняване генотипната чувствителност на различните генотипове *C. reinhardtii* са в добра корелация помежду си.

5. Използване на подобрите биоиндикаторни щамове и биомаркери за оценка на генотоксичния/мутагенния потенциал на природни проби и мултифункционални биоминерални продукти за земеделието и екологията

Валидността на горепосоченото твърдение, че дивият генотип 137C е подходящ за разкриване наличието на биоактивни субстанции с генотоксичен и мутагенен потенциал в природни проби с неизвестно съдържание, е потвърдена от нашите експерименти. Изследвани са замърсени почвени, въздушни и водни проби за потенциален генотоксичен/мутагенен ефект, чрез използването на следните критерии: клетъчно

преживяване (метод на макроколонните); тест на “видимите” мутации; съдържание на МДА, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и фотосинтетични пигменти. Получените резултати за генотоксичния и мутагенния потенциал на пробите, представени подробно в съответните публикации, корелират добре с данните на РИОСВ за екологичната ситуация в изследваните региони. Следователно био-тестът на базата на *C. reinhardtii* (WT 137C) може да се използва успешно в скрининга за генотоксичност на различни видове замърсени проби - почва, вода и въздух и за оценка на генотоксичния и мутагенния потенциал на различни видове замърсители- тежки метали (в нива по-ниски и/или малко над пределно допустимите концентрации), следи от пестициди, отпадни газове, микроскопични прахови частици. Освен това този нескъп, надежден и бърз *C. reinhardtii* био-тест може да се препоръча за използване в растителната генотоксикология, тъй като резултатите, получени за едноклетъчните зелени водорасли могат да се екстраполират за висшите растения.

На базата на дивия генотип 137C е разработен и тест за анализ на биоактивността на мултифункционални биоминерални продукти (препарати от биотрансформиран патешки тор) за нуждите на земеделието и екологията. Използвани са три чувствителни биотеста: спот-тест; тест на микроколониите и индукция на ДВР в ДНК. Получените резултати (представени детайлно в съответната публикация) показват, че тестираните проби стимулират клетъчното делене и не проявяват ДНК-увреждащо действие. Различните условия за гранулиране не повлияват отрицателно свойствата на биотрансформирания патешки тор. Доказателство, че получените при *C. reinhardtii* резултати могат да се екстраполират за висши растения, са независимо проведените от нас експерименти с *Petunia hybrida pendula* от “Озеленяване ЕАД” – София. При тези експерименти е установено, че декоративните качества на *Petunia hybrida pendula* се подобряват след третиране с биотрансформиран патешки тор (YUGRA). Следователно биотрансформираният патешки тор може да бъде препоръчан като тор за селското стопанство, щадящ околната среда.

В обобщение, резултатите, получени при разработването на настоящия дисертационен труд предлагат два нови био-теста на базата на *C. reinhardtii*, които успешно могат да се прилагат в генотоксикологията за разкриване на генотоксичния/мутагенния потенциал на антропогенни фактори с различен произход.

## Изводи

1. На базата на микробиологични критерии е установено, че дефектният по *mismatch*-репарация генотип UVS-14, дефектният по *rec*-репарация генотип UVS-10 и генотипът без клетъчна стена CW15 са с висока чувствителност към индуктори на окислителен стрес (зеоцин и CdCl<sub>2</sub>). Високо ниво първично индуцирани ДВР се наблюдава при дефектните по репарация генотипове UVS-14 и UVS-10 след третиране със зеоцин и CdCl<sub>2</sub>. Дефектният по *rec*-репарация генотип UVS-10 се характеризира с най-висока ДНК-чувствителност към ниски концентрации зеоцин.
2. Зеоцин и CdCl<sub>2</sub> индуцират най-силен окислителен стрес, измерен като повишени нива на МДА и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, в дефектния по *mismatch*-репарация генотип UVS-14.
3. Двата индуктора на окислителен стрес - зеоцин и CdCl<sub>2</sub>, независимо от спецификата си на действие предизвикват повреди в ДНК, за отстраняването на които е необходимо участието на *rec*- и *mismatch*-репарация.
4. Установено е, че CdCl<sub>2</sub> е мутаген, който индуцира локус специфични повреди в ядрената ДНК (CAN1 локус, група на свързване VII) и води до стесняване на мутационния спектър при *S. reinhardtii* - индуцират се само три типа “видими” мутации - дребни, пигментни и мозаечни. С най-висока мутабилност към CdCl<sub>2</sub> се характеризира дефектният по *mismatch*-репарация генотип UVS-14.
5. Не е установена корелация между степента на окислителния стрес и генотоксичността/мутагенността на водните проби от река Искър и река Лесновска. Почвените и въздушни проби от село Яна се характеризират с най-силно генотоксично и мутагенно действие. Установената сезонна динамика в генотоксичното и мутагенното действие на почвените (от с. Локорско и с. Яна) и въздушните (от ж.к. Павлово и гара Яна) проби корелира добре с данните на РИОСВ за променената екологичната обстановка в изследваните региони.
6. Биотрансформираният патешки тор няма генотоксичен и ДНК-увреждащ потенциал и е безвреден за използване в земеделието. Резултатите са потвърдени от независимо проведени от “Озеленяване ЕАД” – София експерименти с *Petunia hybrida pendula*.



## Справка за научните приноси на дисертацията

### **А. Приноси с оригинален характер**

1. На базата на комплекс от критерии - преживяване (спот-тест, метод на микро-/макроколонии); индукция на ДВР, съдържание на МДА,  $H_2O_2$  и каротеноиди, като най-подходящи за целите на генотоксикологията в лабораторни условия са предложени следните генотипове *C. reinhardtii*:

- 137C (див тип) като биоиндикатор за разкриване наличието на биоактивни субстанции в проби с неизвестно съдържание;
- UVS-10 (дефектен по *rec*-репарация) и UVS-14 (дефектен по *mismatch*-репарация) за получаване на първоначална информация относно механизма на действие на биологично активните субстанции в изследваните проби.

### **Б. Приноси с потвърдителен характер:**

1. Потвърден е потенциалът на зеоцин и на  $CdCl_2$  да индуцират окислителен стрес във фотосинтезиращи еукариоти.

### **В. Оригинални приноси с приложен характер**

На базата на *Chlamydomonas reinhardtii* (WT 137C) са разработени и предложени два сравнително нескъпи, надеждни и бързи био-теста за целите на генотоксикологията:

1. Био-тест за разкриване на генотоксичния и мутагенния потенциал на природни проби (почва, вода и въздух), замърсени с различни видове ксенобиотици - тежки метали (в нива по-ниски и/или малко над пределно допустимите концентрации), следи от пестициди, отпадни газове, микроскопични прахови частици и др. Включени са следните критерии: клетъчно преживяване; тест на “видимите” мутации; биохимични биомаркери за окислителен стрес - МДА,  $H_2O_2$  и пигменти.

Разработката е методичен принос към Директива 2010/63/ЕС и анекс 6.3.3.1 на Седма рамкова програма на Европейския Съюз за научни изследвания, технологично развитие и демонстрационни дейности 2007-2013.

(Проект NATO-SfP 977977, “Improved monitoring of Environmental Carcinogenes by Principally New Tests”.)

2. Тест за анализ на биоактивността на мултифункционални биоминерални продукти (препарати от биотрансформиран патешки тор) за земеделието и екологията,

включващ следните критерии: спот-тест; клетъчно преживяване; индукция на ДВР.

Разработката е принос към екологичното земеделие.

(Проект МИЕ–Иновационен фонд, ИФ-02-24/05, ”Разработване на методи за получаване на мултифункционални биоминерални продукти за земеделието и екологията – БИО-ПРАГ”)

## Списък на публикации по темата на дисертацията

### Излезли от печат:

1. Чанкова, С., **Димитрова, М.**, Капчина-Тотева, В. (2006). Нов, нетрадиционен биотест с използване на *Chlamydomonas reinhardtii* за скрининг на генотоксичния и мутагенния потенциал на водни проби. Сб. Научни трудове, Шести Международен Симпозиум „Екология-Устойчиво Развитие”, Враца, 19-20 октомври 2006, стр. 131-138.
2. **Dimitrova, M.**, Dimova, E., Mitrovska, Z., Kapchina-Toteva, V., Chankova, S. (2007). Testing of polluted soil samples for genotoxic potential using *Chlamydomonas reinhardtii*. Alg. Stud. (123): 111-121. (IF = 1,02)
3. **Dimitrova, M.**, Mitrovska, Z., Kapchina-Toteva, V., Dimova, E., Chankova, S. (2009). Testing of polluted air samples for genotoxic potential using *Chlamydomonas reinhardtii*. Compt. rend. Acad. bulg. Sci. 62(1): 57-62. (IF = 0,106)
4. Miteva, D., Mitrovska, Z., **Dimitrova, M.**, Chakalov, K., Asenov, L., Enakiev, Y., Chankova, S. (2009). Testing of genotoxic potential of Bio-transformed duck guano using *Chlamydomonas reinhardtii* test-system. Proceedings of Seminar “Ecology 2009”, 23-24 April, Sofia, p 187-193.

### Под печат:

1. **Dimitrova, M.**, Miteva, D., Mitrovska, Z., Chankova, S. (2014). Cadmium induced stress response in different genotypes of *Chlamydomonas reinhardtii*. Compt. rend. Acad. bulg. (in press) (IF = 0,211)

### Подготвени за печат:

2. **Dimitrova, M.**, Miteva, D., Mitrovska, Z., Chankova, S.G., Zeocin induced stress response in *Chlamydomonas reinhardtii* depends on the genotype. Environmental Toxicology and Safety (IF = 2,203)

## Списък на цитиранията

**Dimitrova, M.**, Mitrovska, Z., Kapchina-Toteva, V., Dimova, E., Chankova, S. (2009). Testing of polluted air samples for genotoxic potential using *Chlamydomonas reinhardtii*. Compt. Rend. Acad. bulg. Sci. 62 (1), 57-62, ISSN: 1310-1331, (IF = 0,106).

1. Lyubenova, V., Ignatova, M. (2011). Cascade sensor for monitoring of denitrification in activated sludge wastewater treatment process. Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci. 64 (3), 395-404, ISSN: 1310-1331, (IF=0,204).

## Списък на участията в научни форуми, отразяващи изследванията по дисертацията

1. **Димитрова, М.**, Махмуд, А., Чанкова, С., Капчина-Тотева, В. (2006). Скрининг за генотоксичност и мутагенност на антропогенно замърсени проби от почва с използването на зеленото едноклетъчно водорасло *Chlamydomonas reinhardtii*. V Национална Конференция по Химия за Студенти и Докторанти, София, 17-19 май 2006.
2. **Димитрова, М.**, Митровска, Ж., Капчина-Тотева, В., Чанкова, С. (2007). Скрининг на генотоксичния потенциал на антропогенно замърсени почвени проби с използването на микроводораслото *Chlamydomonas reinhardtii*. Семинар „Еволюция и екология-3” – СУБ, София, 19-20 април 2007.
3. **Димитрова, М.**, Митровска, Ж., Капчина-Тотева, В., Чанкова, С. (2007). Скрининг за генотоксичност на антропогенно замърсени проби от въздух с използването на зеленото едноклетъчно водорасло *Chlamydomonas reinhardtii*. VI Национална Конференция по Химия за Студенти и Докторанти, София, 16-18 май 2007.
4. **Dimitrova, M.**, Dimova, E., Mitrovska, Z., Kapchina-Toteva, V., Chankova, S. (2007). Is *Chlamydomonas reinhardtii* good enough for eco-toxicological research? In: III Congress of Ecologists of Macedonia, 6-9 Oct. 2007, Struga, Macedonia. (постер).
5. **Димитрова, М.**, Митровска, Ж., Махмуд, А., Димова, Е., Капчина-Тотева, В., Чанкова, С. (2008). Сравнителен анализ на антропогенно замърсени почвени и въздушни проби от района на село Яна (Софийска област). Семинар „Екология-2008” – СУБ, 17-18 април 2008, София.
6. **Dimitrova, M.**, Dimova, E., Miteva, D., Mitrovska, Z., Chankova, S. (2009). *Chlamydomonas reinhardtii* as a model indicator system for genotoxicity of low doses xenobiotics. “Семинар по екология – 2009”, 23-24 април 2009, София.
7. **Dimitrova, M.**, Miteva, D., Mitrovska, Z., Chankova, S. (2014). Stress response of *Chlamydomonas reinhardtii* strains to zeocin depends on the genotype. “Seminar of Ecology – 2014 with international participation”, 24 – 25 April 2014, Sofia.

# ***CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* AS A MODEL INDICATOR SYSTEM FOR GENOTOXICITY OF LOW DOSES XENOBIOTICS**

**Maria Dimitrova Todorova**

PhD thesis, Sofia, 2014

Institute of Biodiversity and Ecosystem Research

Bulgarian Academy of Sciences

2 Gagarin Street, 1113 Sofia, Bulgaria



**Supervisor: Prof. Stephka Chankova, PhD**

## **SUMMARY**

**Relevance of the problem:** The development of highly sensitive bioindicator and biomarker systems for detection of low doses bioavailable xenobiotics in the environment is very important aspect of environmental genotoxicology. Moreover evaluation of the genotoxic/mutagenic potential of xenobiotics on photosynthetic organisms as primary producers needs to be done. This problem is closely related to plant biodiversity; genome protection and stability of plant populations growing in contaminated areas. Additionally the problem is also relevant to Directive 2010/63/EU aiming to firmly anchor the principle of the “Three Rs, to Replace, Reduce and Refine” the use of animals for experimental and scientific purpose in the EU Member States. According to Anex (47), there is an increasing need for new methods to be developed and proposed for validation in the European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing (EURL ECVAM) ([http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam)).

***Chlamydomonas reinhardtii* as a model:** The photosynthetic unicellular green alga is a robust model for plant cell and meets the requirements of modern ecotoxicology for "good" test-systems postulated by Weber et al., (2000): quick methods, relatively inexpensive, good resolution, sensitivity, potential for extrapolation of results to higher eukaryotes.

**Hypothesis:** An eukaryotic bioindicator and biomarker system for detection of low doses xenobiotics with different mode of action could be developed based on strains *C. reinhardtii* that differ in their DNA repair capacity (two DNA repair deficient - UVS-10, *recombination*-repair deficient and UVS-14, *mismatch*-repair deficient, and two DNA repair proficient strains - 137C, wild type and CW15, cell-wall-less).

**Main results:** High susceptibility to zeocin and CdCl<sub>2</sub>, defined as decreased cell survival, increased MDA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quantities, and high primary induced DSBs levels is observed in DNA-repair deficient genotypes UVS-10 and UVS-14. It could be speculated that zeocin and CdCl<sub>2</sub> could induce two types of DNA damage in photosynthetic eukaryotes: DNA damage repaired via *recombination* repair and DNA damage repaired via *mismatch* repair.

We recommend 137C WT for revealing the presence of bioactive substances in samples with an unknown content. Two DNA repair deficient genotypes (UVS-10 and UVS-14) are convenient for receiving additional initial information about mechanism of action of the biologically active substances in samples. Further these DNA repair deficient strains could be successfully involved in genotoxicology for the revealing of low doses contaminants.

**Contribution:** In the thesis, two rapid, high sensitive and inexpensive bio-tests based on the 137C WT were developed for the genotoxicology purposes: 1) Bio-test for evaluation of the genotoxic and mutagenic potential of water, soil and air samples polluted with different types of xenobiotics – heavy metal (below and/or slightly above MAC), traces of pesticides, PM<sub>10</sub>, waste gases, etc. Three endpoints were used: colony forming ability (“clonal” assay), induced “visible” mutants and biomarkers for oxidative stress - MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and pigments. 2) Bio-test for the bioactivity analysis of multifunctional bio-mineral products (bio-transformed duck guano granulated under different temperatures and pressure conditions) for the agriculture and ecology. Spot-test, micro-colony cell survival assay, and DSB induction were applied as endpoints.

In addition these not expensive, reliable and quick *C. reinhardtii* bio-tests could be recommended for using in plant ecotoxicology because the results obtained in algal cells could be extrapolated to higher plants.