

Справка за приносите

в научните публикации на гл. ас. д-р Светла Петкова Гатева, във връзка с участието в конкурс за академичната длъжност „доцент” по професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност "Генетика"

Според направената справка на по-важните приноси на моите изследвания, те може да се групират в няколко основни направления: 1) скрининг за генотоксичност на мутагенни фактори от околната среда - хербициди, тежки метали, отпадни продукти от производството на етерични масла, УВ радиация; 2) генетични и биохимични промени в диворастящи и моделни растения под въздействие на абиотични стресови фактори и толерантност към абиотичен стрес; 3) антимуtagenеза чрез използване на синтетични и природни растителни съединения, растителни екстракти, етерични масла и други продукти от растителен произход, адаптивен отговор; 4) модифициране на увреждащия ефект на тежки метали, чрез използване на едноклетъчни зелени водорасли; 5) изследвания в областта на генетичния мониторинг за проучване на ефекта на някои абиотични фактори от околната среда върху растителни видове в планински екосистеми; 6) приноси от методичен характер, свързани с адаптиране и прилагане на методи за детекция на увреждания в ДНК.

1. Скрининг за генотоксичност на мутагенни фактори от околната среда

Замърсяването на околната среда с хербициди и тежки метали е сериозен проблем на съвременното общество. Директният контакт с тях, както и попадането им в храната, би причинило сериозни увреждания на ДНК, което би довело до нестабилност на генома, редица заболявания и дори смърт. Анализът на цитотоксичната и кластогенната активност на хербициди, тежки метали и други мутагенни фактори от околната среда чрез чувствителни тест-системи и подходящи методи има непосредствено практическо значение за оценка на потенциалната опасност и риска за човека от употребата им. Това дава възможност за изграждане на комплексна хигиенна оценка и нормиране, като се предприемат мерки за ограничаването на контакта с мутагенните фактори.

Човешките лимфоцитни култури са подходящ тест обект за провеждане на тестиране чрез краткосрочни тестове за бързо и достоверно откриване на увреждания на ДНК - хромозомни аберации, микроядра и други, както и за анализ на цитотоксичния ефект на различни по природа увреждащи фактори.

- ✓ Чрез цитогенетичен анализ, с прилагане на теста за индукция на хромозомни аберации и на теста за микроядра е проучена и сравнена цитотоксичната и

генотоксичната активност на неселективния широкоспектърен бипиридилов хербицид Паракват (ПК) при два типа филогенетично отдалечени тест-системи — коренова меристема на ечемик (*Hordeum vulgare*) и човешки лимфоцити *in vitro* в концентрационния градиент 10^{-6} - 10^{-4} мол/л [Публикации 1 и 2]. Установено е, че паракватът проявява дозозависим генотоксичен ефект, като повишава честотата на хромозомните аберации и на микроядрата при двететест-системи. Повишаването на генотоксичния ефект съответства на намаляването на нивата на митотичната активност в клетките. В структурно реконструирания кариотип МК14/2034 на ечемик е установено специфично за параквата разпределение на т.н. „аберационни горещи точки“, непропорционално на дължината на хромозомите. „Горещите точки“ са в ограничен брой сегменти на хромозомите в участъците с хетерохроматин. Установена е по-висока чувствителност на човешките лимфоцити към хербицида в сравнение с ечемика. Изследванията допринасят за оценка на риска за човека и другите организми от употребата на хербициди от този тип, класифициран от ЕРА като потенциален канцероген.

- ✓ Апоптозата (програмираната клетъчна смърт) е естествен процес, който възниква в отговор както на ендогенни фактори, целящ запазване целостта и функциите на тъкани и органи чрез бързо ограничаване растежа и развитието на клетките, а така и в отговор на цитотоксични увреждания от екзогенни фактори. Уврежданията в ДНК на клетката от екзогенни фактори могат да индуцират апоптоза. Чрез проведените изследвания с хербицида Паракват (ПК) при човешки лимфоцити е установено, че той предизвиква дозозависима индукция на апоптоза и хромозомни аберации, в съответствие със забавяне на клетъчния цикъл [Публикация 8]. Апоптотичните клетки се наблюдават не по-късно от 2-ия час след третирането, като процесът продължава до пълното елиминиране на сериозно увредените клетки. Проучването допринася за по-пълната и информативна оценка на уврежданията, предизвикани от ПК.
- ✓ При човешки лимфоцити е проучен цитотоксичният и генотоксичният ефект на широко използвания в доста страни, вкл. и у нас системен хербицид Раундъп (с активно вещество глифозат). Хербицидът беше приложен директно в концентрации, използвани в практиката и индиректно, чрез третиране с екстракт от растения ечемик, въздействани в полски условия с хербицида [Публикация 15]. Раундъп проявява изразена цитотоксичност и дозозависима генотоксична активност след директно третиране в приложените концентрации. Генотоксичният ефект, отчетен след третиране с екстракт от растения от покълнали семена на ечемик, третиран с Раундъп, е близък до наблюдавания след директно третиране с хербицида с по-ниска концентрация (0,9 мкг/мл).

Проучването дава ценна информация за потенциалния риск за хората, чиято ежедневна диета включва третирани растения.

- ✓ Анализирана е чувствителността на човешки лимфоцити на донори от различен пол и възраст към концентрации CdCl_2 ($10^{-6} - 10^{-4}$ мол/л) чрез комплекс от методи за цитотоксичност и генотоксичност [Публикация 3]. Установена е индивидуална чувствителност на лимфоцитите към CdCl_2 , зависима от приложената концентрация. Чувствителността на клетките към CdCl_2 не зависи от възрастта и пола. Чрез прилагането на цитогенетичен анализ на индуцираните хромозомни повреди в лимфоцитни култури, е проучен ефекта и на различни концентрации CuSO_4 (извън предоставената справка). Използването на различни показатели за оценка на цитотоксичната и генотоксичната активност позволява по-пълна оценка на риска за организмите, изложени на тежки метали. Резултатите имат пряко практическо значение.
- ✓ При човешки лимфоцитни култури е проучен цитотоксичният и генотоксичният ефект на дози УВ-С радиация ($10\text{-}150 \text{ Дж/м}^2$) след облъчване в лабораторни условия. Установена е ясно изразена дозова зависимост по отношение индуцираните хромозомни повреди. Значението на УВ-С радиацията за организмите нараства с разрушаване на озоновия слой на атмосферата. Проучването на ефекта от УВ въздействието е от значение за практиката с цел прилагане на вещества със защитен ефект спрямо индуцираните увреждания на ДНК [Публикация 7].
- ✓ При производството на ценните етерични масла от българските рози *Rosa damascena* Mill. и *Rosa alba* L. в околната се отделя голямо количество отпадна вода, смятана за биозамърсител. С оглед на оценка на ефекта ѝ върху ДНК, е анализирана цитотоксичната и генотоксичната активност на отпадни води, получени от водно-парната дестилация на масла на тези рози при два различни типа експериментални тест-системи (растителна и лимфоцитна тест-система) с помощта на методи за генотоксичност [Публикация 20]. Отпадните води индуцират невисок генотоксичен ефект, по-силно изразен при лимфоцитните култури, в сравнение с този при растителни ечемичени клетки.

2. Генетични и биохимични промени в диворастящи и моделни растения под въздействие на абиотични стрес фактори, толерантност към абиотичен стрес.

Климатичните и антропогенните фактори са от съществено значение за развитие на организмите. В резултат на тяхната промяна могат да възникнат редица промени, както и носителя на наследствената информация, така и във фотосинтетичния апарат на растенията. Това зависи от продължителността, степента на въздействието на тези фактори от генотипа на организмите. Изследването на комбинирания ефект от въздействието на абиотичните фактори върху организмите дава ценна информация за степента им на адаптация към околната среда.

- ✓ Изследван е ефектът на комбинирано въздействие на естествения радиационен фон, УВ радиацията и климатичните промени върху растителна ДНК на 14 вида диворастящи растения от различни семейства от три високопланински региони на Рила, чрез прилагане на молекулярни и цитогенетични методи [Публикация 13]. Установена е видова толерантност към комбинирания ефект на УВ, йонизираща радиация и други фактори на околната среда, както и нанадморската височина. Получените резултати са полезни за провеждане на генетичния мониторинг за изясняване на ефекта на фактори от околната среда върху диворастящи растения в планински райони, както и за избор на подходящи биоиндикатори за радиационно натоварване - УВ, гамма радиация и бета активност.
- ✓ Оценен е потенциалът на продължително УВ облъчване в естествени планински условия да индуцира увреждания в ДНК (индукция на микроядра) на растителни видовете от сем. Роасаеае, растящи в планински условия, като ефектът е сравнен с този в моделен растителен вид, облъчван в контролирани лабораторни условия [Публикация 16]. Анализът е проведен на четири диворастящи растителни вида, характерни за екосистемите на Рила на три различни височини (1500м, 1782м и 2925м) в три последователни вегетационни сезона. Моделното растение *Hordeum vulgare* L. е облъчвано с УВ-А и УВ-В в УВ симулатор в за период от 10, 20, 30 и 43 дни. Установена е вариабилност в отговора на УВ облъчването при диворастящите. При моделното растение, облъчено в лабораторни условия нивото на увреждане е по-високо от това при растения, растящи в планински условия. Растенията от най-голямата надморска височина проявяват ниска степен на увреждане, дължащо се на факта, че в естествена среда УВ облъчването се комбинира с други абиотични стрес фактори, и се включват различни механизми на адаптация, докато в лабораторни условия е изследван ефектът на един фактор за ограничен период от време.
- ✓ При пет растителни вида, характерни за екосистемите на Рила, от три надморски височини е изследвано дали съществува зависимост между количественото съдържание на пигментите в диворастящи растителни видове и надморската височина [Публикация 17]. Получените данни показват, че нивата на общите

хлорофили, chl. a, chl. b и общите каротеноиди за растения от 1500 м са по-ниски или подобни на тези в растения на контролната надморска височина в София. За едногодишния период на изследването не е установена промяна в съотношението на хлорофил a/b, в растенията на двете по-ниски височине 1500 м и 1782 м. Липсата на промяна в съотношението на хлорофил a/b може да е индикация, че надморската височина няма траен увреждащ ефект върху фотохимичната система на листата. Тъй като съдържанието на хлорофил в растенията е индикатор за реакцията им към местообитанието и атмосферните условия, дългосрочните мониторингови изследвания, с използването и повече растителни видове ще дадат по-пълна информация.

3. Антимутагенеза чрез използване на синтетични и природни растителни съединения, растителни екстракти, етерични масла и други продукти от растителен произход, адаптивен отговор

За намаляване на мутагенното натоварване и защита на генома на клетките от различни ДНК увреждащи фактори, се използват разнообразни стратегии, един от които е съединения, наречени антимутагени. Те могат да бъдат както със синтетичен произход, така и с естествен, растителен. Наред с антимутагенния потенциал на различни по произход съединения, се изпитва и защитният потенциал на разнообразни растителни екстракти, масла и други продукти от растителен произход. В изследванията се прилагат различни експериментални схеми, като се проучва и потенциалът на съединенията да индуцират адаптивен отговор спрямо някои директни мутагени. Изследвания от този тип са полезни за изясняване на механизмите на мутагенезата и антимутагенезата, адаптивния отговор, както и за фармацевтичното и медицинско приложение на тези съединения и продукти.

- ✓ Анализирани са потенциалът на синтетичното съединение 1-(4-флуорофенил тиокарбамоил)-4-метил-пиперазин (ФТМП), производно на тиоурейта да намали цитоксичния и генотоксичния ефект на хербицида паракват в *H. vulgare* и човешки лимфоцити *in vitro*, като са приложени подходящи експериментални схеми на третиране [Публикация 2]. Самостоятелно съединението проявява слаб генотоксичен ефект и в двете тест-системи. Приспособяващо третиране с ниски, неувреждащи концентрации ФТМП (10^{-6} , 5×10^{-6} и 10^{-5} мол/л), последвано от различно по продължителност време между третиранията намалява честотата на хромозомните аберации и микроядрата, индуцирани от паракват. Съединението ФТМП осигурява защита на генома спрямо увреждащото действие на хербицида, като ефектът му и при двете тест-системи е в един и същи диапазон. ФТМП приложено в адаптиращи нетоксични концентрации намалява честотата на индуцираните хромозомни аберации и от УВ-С радиация ($100-150 \text{ Дж/м}^2$) в човешки лимфоцитни клетки, като ефектът зависи от продължителността на интервала между приспособяващото третиране със

съединението и увреждащото с радиация [Публикация 7]. Получените данни за такъв тип новосинтезирани съединения са от значение не само за изясняване механизмите за защита на генома от увреждания, но и за приложението на такива вещества в практиката.

- ✓ Изследван е потенциалът на новосинтезираното съединение 1-1' хексаметиленбис [3-(3,5-дихлоро-4-пиридил)] урея (ХМПУ) и способността му да индуцира адаптивен отговор (АО) към химични мутагени в различни тест-системи [Публикация 6]. Установено е, че съединението е индуктор на окислителен стрес и проявява адаптивен отговор в растителна тест-система ечемик и човешки лимфоцити *in vitro*, приложен в нетоксични концентрации. АО е по-добре изразен с нарастване на времевия интервал междуприспособяващата концентрация от съединението и увреждащата от стандартнихимични мутагени.
- ✓ Разработена е глава от книга, в която е обобщена наличната в литературата научна информация за химичната структура на новосинтезирани биологично- активни съединения, базирани на комбинация от два или три типа активниструктурни единици: 5- или 6-хетероциклени ядра, карбамид/тиоуреен мост и алкиленуреидо/тиоуреидо групи [Публикация 22]. Анализирани са регулиращите растежа на растенията и стрес-защитната активност на тези съединения, за да се определи как различните структурни комбинации могат да повлияят на типа активност и нейния интензитет. Охарактеризирани са биологични ефекти на базата и на собствени изследвания на всеки клас съединения в зависимост от химичната структура, като намаляване на генотоксичния ефект на ултравиолетовото С (УВ-С) и гама-лъчението, защитния ефект към хербициди и индуктори на оксидативен стрес, стимулиращия ефект върху микроразмножаването на висши растения, анти- стареещи, и регулиращи растежа на растенията. За специфичните ефекти на съединенията върху физиологичните, биохимичните, клетъчните и генетичните процеси са използвани данните от различни тест-системи (растения, човешки лимфоцити и др.) и експериментални постановки.
- ✓ Проучен е ДНК защитният ефект на природните съединения кемпферол и ятрофам, изолирани от *Lilium candidum* L. спрямо радиомиметика зеоцин, като са използвани показатели за генотоксичност при растителна и лимфоцитна тест-система [Публикация 4]. Анализирани са цитотоксичните, генотоксичните и антиоксидантните активности и на монотерпеноида гераниол (компонент на етеричните масла) в концентрации (10-100 мкг/мл), като е оценен и неговия антицитотоксичен и анти-генотоксичен потенциал спрямо експерименталния

директен мутаген N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (МННГ) в растителна и лимфоцитна тест-системи [Публикации 5, 12]. Природните съединения проявяват нисък цитотоксичен и кластогенен ефект в човешки лимфоцити *in vitro* и в коренови меристемни клетки на ечемик, зависимо от приложената концентрация. И трите съединения от растителен произход показват изразен потенциал за намаляване на увреждащия (цитотоксичен и генотоксичен/кластогенен) ефект на директните мутагени. Антицитотоксичният/анти-генотоксичният ефект на кемпферол и ятрофам зависи от експерименталния дизайн и използваната тест-система, докато ефектът на гераниола се проявява независимо от това. Гераниол проявява добър капацитет за поглъщане на свободни радикали. Получените данни могат да бъдат полезни за изясняване на фармакологичния потенциал и активността на съединения от естествен, растителен произход с оглед приложението им във фармацията и други области на живота.

- ✓ Изследвана е цитотоксичната/генотоксичната активност и защитния анти-мутагенен потенциал на етерично масло от българска *Rosa alba* L., (получено при водно-парна дестилация) в растителна и лимфоцитна тест-системи [Публикация 14]. Цитогенетичният анализ показва сравнително нисък цитотоксичен ефект в двете тест-системи и невисока дозозависим генотоксичен ефект в човешките лимфоцити *in vitro*. Розовото масло проявява антицитотоксичен/анти-генотоксичен ефект към алкилиращия мутаген МННГ, като намалява честотата на хромозомните аберации и на микроядрата, индуцирани от мутагена, независимо от използваните експериментални схеми. Данните от хроматографския анализ показват, че етеричното масло от българска бяла роза съдържа вещества, които чрез проведения цитогенетичния анализ при тест-системите проявяват защитен ефект, като се намаляват уврежданията в ДНК. Данните са полезни за по-нататъшното използване на етеричното масло в медицинската козметика и фитотерапията.
- ✓ Проучена е и биологичната активност на воден екстракт от *Papaver rhoeas* L., способността му да намалява предизвиканите от радиомиметика зеоцин цитотоксични/генотоксични ефекти в растителна и лимфоцитна тест-системи [Публикация 10]. Проведени са анализи и на антимуtagenния ефект и на воден екстракт от *Salvia officinalis* L. (извън предоставената справка). Получена е информация относно чувствителността на растителните хромозоми на базата на „аберационни горещи точки“ при различни експериментални условия на третиране. Екстрактите от полски мак и градински чай, приложени в по-висока, но слабо токсична концентрация, показват добре изразен защитен,

антимутагенен потенциал към мутагена, като намаляват честотата на хромозомните аберации и микроядрата, индуцирани от радиомиметика.

- ✓ Наличието на ценни биологично активни съединения в отпадните води от водно-парната дестилация на етерични масла от *R. damascena* Mill. и *R. alba* L., установено от колеги, бе основание за проучване на защитния потенциал на водите спрямо ДНК генотоксини. Наред с проучванията, съобщени по-горе в [Публикация 20] за цитотоксичния/генотоксичния ефект на отпадните води, е установено, че те проявяват цитопротективно/генопротективно действие спрямо директния мутаген МННГ. В нетоксични концентрации и приложени в различни експериментални схеми на третиране, те могат да намалят увреждането на ДНК, индуцирано от алкилиращия агент. Данните са обещаващи за по-нататъшното приложение на тези продукти във фармацията и други области на човешкия живот, а оползотворяването на тези продукти би довело до намаляване на количеството отпадъци в околната среда.
- ✓ С колектив от учени е обобщена информацията, налична в литературата относно ботаническите характеристики, фитохимичния профил и биологичните активности на някои представители на семейство Rosaceae - *Rosa damascena* Mill., *Rosa alba* L., *Rosa centifolia* L. и *Rosa gallica* L., широко използвани в хранително-вкусовата промишленост, парфюмерията и козметиката [Публикация 19]. Анализирани и сравнени са основните биологични активности на техните етерични масла, хидрозоли и екстракти. Наличието многобройни биологично активни вещества, като флавоноиди (напр. флавони, флавоноли, антоцианини), ароматни компоненти (монотерпени, сесквитерпени) и хидролизиращи се танини и кондензи, определя широк аспект от биологични активности, като антиоксидантна активност, антирадикалова, антимутагенна, антиканцерогенна, антивирусна, антимикробна. Това дава възможност за използването на етеричните масла, хидрозоли и екстрактите като профилактични и лекарствени средства за много заболявания.

4. Модифициране на увреждащия ефект на тежки метали, чрез използване на едноклетъчни, зелени водорасли

Като един от методите за отстраняване на тежки метали и други генотоксини, замърсители на околната среда (ремедиация) е използването на живи организми – растения, както и едноклетъчни водорасли.

- ✓ Получено е експериментално доказателство при човешки лимфоцитни култури, че цитотоксичният и генотоксичният ефект на CdCl_2 може да бъде модифициран в резултат от жизнената активност на едноклетъчното зелено водорасло

Chlamydomonas reinhardtii [Публикация 9]. Начинът на действие зависи от концентрациите на тежкия метал и вида на супернатантите, получени от водораслото. Данните са полезни и биха послужили за целите на биоремедиацията.

5. Изследвания в сферата на генетичния мониторинг за проучване на ефекта на някои абиотични фактори от околната среда върху растителни видове в планински екосистеми.

Проследяване на генетичните изменения, настъпващи в клетките в резултат на различни въздействия от околната среда за известен период от време е от съществено значение. По този начин може да се установява ефекта на променящата се интензивност на стрес-факторите, както и степента на адаптация на организмите към тези фактори и генотипната чувствителност. Използването на растителни видове, които естествено обитават средата дава една по-реалистична оценка.

- ✓ Оценена е толерантността на избрани диворастящи видове от естествени екосистеми на три височини в Рила (1500, 1782 и 2925 м) към променящите се условия на околната среда чрез промените настъпващи в ДНК, в резултат на УВ радиация, йонизираща радиация и други абиотични стресове при тригодишни мониторингови изследвания [Публикация 18]. Използван е набор от цитогенетични и молекулярни тестове, адаптирани и приложени от нас към дивни растителни видове от семейства Onagraceae, Rosaceae, Boraginaceae, Saxifragaceae, Orobanchaceae, Asteraceae и Poaceae. Установена е различна видова толерантност, като ДНК на представителите на Poaceae е по-малкоподатлива на увреждане от другите изследвани видове и на трите височини. По-ниските нива на увреждане на ДНК на тези дивни растителни видове съответстват на по-ниската им способност да натрупват радионуклиди. Видовете, растящи на най-висока надморска височина показват ниско ниво на ДНК увреждания, което е индикатор за адаптация към постоянно променящите се условия на средата.

6. Приноси от методичен характер, свързани с адаптиране и прилагане на методи за детекция на увреждания в ДНК

- ✓ Приложен и адаптиран успешно за човешки лимфоцити *in vitro* е протоколът за гел електрофореза в постоянно електрично поле (CFGE), разработен от проф. Чанкова и проф. Брайън при *C. reinhardtii* [Публикация 11]. С помощта на този метод е сравнена чувствителността на ДНК на лимфоцити на пушачи и непушачи към радиомиметика зеоцин. Установено е, че ДНК на лимфоцити от пушачи е по-податлива на увреждане от тази на непушачите, като нивото на

индуцираните двуверижни разриви (ДВР) от зеоцин при пушачите е по-високо от това в ДНК на непушачи. Най-висока индукция на ДВР е установена за високите концентрации на зеоцин и при двата типа донори.

- ✓ Разработена е глава от книга на базата на собствени резултати и на информацията, налична в литературата, разглеждаща основните фактори, които индуцират двуверижни разриви в ДНК и методите за детекция на тези повреди [Публикация 21]. Охарактеризиран е методът – гел електрофореза в постоянно електрично поле, разработен за откриване на двуверижни разриви в ДНК и репаративната им кинетика при различни типове клетки. Разгледани са различните модификации на метода при различни типове клетки и критичните точки при изпълнението му. Изтъкнати са основните му предимства като чувствителност, бързина, икономичност и перспективност, както и недостатъците му. Посочени са областите на приложение.
- ✓ Извън предоставената справка, при лимфоцитни култури от човек е проучен модифициращият ефект на новобиоцин и на кофеин, приложени по различни експериментални схеми на третиране спрямо защитния ефект, индуциран от топлинен шок 42° С към ДНК увреждания от директния експериментален мутаген – триетиленмеланин (ТЕМ). Защитният ефект на топлинния шок може да бъде потиснат или неповлиян от топоизомеразо II инхибитора - новобиоцин и инхибитора на репарацията кофеин в зависимост от приложената експериментална схема. Резултатите са показател за участието на топлинно-шововите протеини и на хроматиновата конформация в механизмите на защита на ДНК от увреждане.
При лимфоцитни култури от човек е установен защитният ефект на топлинен шок и на ниски концентрации тежки метали (CuSO_4 и на $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$), приложени като адаптиращо третиране спрямо увреждащия на ТЕМ. Получените резултати с използване на де ново протеинсинтезния инхибитор циклохексимид, предполагат, включване на различни механизми на защита на ДНК, индуцирани от тежките метали и топлинния шок.