

Справка за приносите

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

Научните приноси в представените за участие в конкурса научни трудове са в областта на приложната цитогенетика, генотоксикологията и оценката на биологичната активност на природни и синтетични съединения. Те могат да бъдат обобщени в следните основни направления:

- (1) Цитогенетичен скрининг и генопротективен потенциал на природни продукти и растителни екстракти (*Rosa* spp.);
- (2) Цитогенетичен скрининг на новосинтезирани аминоксифонати и техни производни;
- (3) Цитогенетичен скрининг на индустриални химични агенти и органични разтворители;
- (4) Екотоксикологични изследвания и оценка на генетичния риск при експозиция на тежки метали при диви и лабораторни дребни бозайници;
- (5) Кариологични и сравнителни цитогенетични изследвания;

Представените изследвания обхващат оценка на генотоксичния и цитотоксичния потенциал на природни и синтетични биологично активни съединения, включително продукти от дестилацията на маслодайни рози (масла, екстракти, отпадни води), новосинтезирани аминоксифонатни производни, индустриални химични агенти и тежки метали. В част от колективните разработки е анализиран и цитопротективният/генопротективният потенциал на растителни екстракти, масла, отпадни продукти от дестилационния процес.

Проучванията са реализирани като системни скринингови изследвания, проведени предимно в краткосрочни експериментални схеми (24 - 48 часа) при контролирани условия. Използвани са утвърдени класически цитогенетични методи - анализ на хромозомни аберации, микроядрен тест и изследване на митотичната активност в *in vitro* и *in vivo* тест-системи. Този мултисистемен подход позволява сравнителна оценка на ефектите в зависимост от нивото на биологична организация и допринася за по-надеждна интерпретация на цито-/генотоксичния и цито-/генопротективния потенциал на изследваните продукти.

1. Цитогенетичен скрининг и генопротективен потенциал на природни продукти и растителни екстракти (*Rosa* spp.) (B4: публ. 1-6, Г8: публ. 16)

Продуктите от маслодайни рози представляват източник на биологично активни вещества с широко приложение в козметиката, фармацевтиката и хранителната индустрия, което налага оценка на тяхната цитотоксична, генотоксична и генопротективна активност.

Проведени са сравнителни цитогенетични изследвания на цитотоксичната/генотоксична активност и цитопротективния/генопротективния потенциал на етерични масла, хидрозоли, отпадни води, получени чрез класическа водно-парна дестилация и на екстракти, получени чрез субкритична водна дестилация на представители на *Rosa* spp. (*Rosa damascena* Mill., *Rosa alba* L., *Rosa centifolia* L. и

Rosa gallica L.). Използван е мултисистемен подход (растителна тест-система, човешки лимфоцити *in vitro* и животински *in vivo* модел - лабораторни мишки линия ICR). Този подход позволява сравнителна оценка на ефектите при организми на различно йерархично ниво на биологична организация и осигурява по-комплексна интерпретация на генотоксичния риск при използването на тези продукти.

Цитотоксична и генотоксична активност на хидрозоли, масла, отпадни води

- Хидрозоли от *Rosa damascena* Mill. и *Rosa alba* L., получени чрез водно-парна дестилация не проявяват съществена цитотоксична и генотоксична активност в изследвания концентрационен диапазон (6 - 20%) при използваните тест-системи. Индуцираните хромозомни аберации и микроядра са близки до контролните стойности, като при по-високи концентрации се наблюдава тенденция към слабо увеличение на ефектите, съпроводено с умерено понижение на митотичната активност; човешките лимфоцити проявяват най-висока чувствителност, а при *in vivo* модела с лабораторни мишки генотоксичната изява е по-ниска, което подкрепя извода за нисък генотоксичен риск при приложените условия (B4: публ. 1).
- Установено е, че хидрозоли от *Rosa centifolia* L. и *Rosa gallica* L. не проявяват цитотоксичност и индуцират ниска генотоксичност в растителна тест-система и човешки лимфоцити, като установената генотоксична активност е концентрационно зависима; цитотоксичният и генотоксичният ефект на *R. centifolia* L. е по-изразен, проявяващ се с повишаване на честотата на хромозомните аберации и микроядрата (B4: публ. 3).
- Сравнителният цитогенетичен анализ на етерично масло от *Rosa damascena* Mill. при три тест-системи показва концентрационно зависими цитотоксични и генотоксични ефекти *in vitro*, докато при *in vivo* модела не се установява генотоксична изява при същите условия. Този контраст между тест-системите подчертава значението на животинския модел - лабораторни линии мишки за допълване и потвърждение на данните от *in vitro* тестовете и избягване на едностранна интерпретация, основана само на *in vitro* данни (B4: публ. 4).
- Цитогенетичните изследвания на екстракти от *Rosa damascena* Mill. и *Rosa alba* L., получени чрез субкритична водна дестилация, показват невисок цитотоксичен ефект в изследвания концентрационен диапазон (6 - 20%) и слабо повишен генотоксичен ефект в растителна и лимфоцитна тест-система, докато при *in vivo* модела - лабораторни линии мишки, се отчита по-ниска или липсваща кластогенна активност при същите експериментални условия. Резултатите *in vivo* демонстрират по-ниска генотоксична изява на екстрактите в условията на цялостен организъм и е ключов резултат за оценката на безопасността на тези продукти, което заедно с липсата на генотоксичност в костномозъчните клетки, определя тези екстракти като безопасни при изследваните концентрации и подходящи за приложение в медицината, хранителната и козметичната индустрия (B4: публ. 5). Тези резултати подчертават допълващата роля на *in vivo* подхода спрямо *in vitro* тест-системите и значението му за по-прецизна интерпретация на генотоксичния и генопротективния потенциал на продуктите от *Rosa* spp.

- В обзорна глава от книга са обобщени и систематизирани цитогенетичните проучвания, проведени на ароматичните продукти от *Rosa alba* L. при трите различни тест-системи. Етеричното масло, хидрозолът и отпадните води не проявяват висока цитотоксичност и генотоксичност при изследваните концентрации. Установена е ниска до умерена кластогенна активност, зависима от концентрацията, химичния състав и чувствителността на използваната тест-система, като човешките лимфоцити отново се отличават с най-висока чувствителност (Г8: публ. 16). Съпоставянето на резултатите от различните тест-системи показва ясно изразена зависимост от нивото на биологична организация, като *in vivo* моделът - лабораторни линии мишки допълва данните от *in vitro* и растителната тест-система, демонстрирайки по-ниска генотоксична изява при част от продуктите и по-комплексна интерпретация на генотоксичния риск.
- Особено внимание е отделено на отпадните води, като страничен продукт от технологичния процес при розопроизводството, тъй като се смятат за биоамърсител. Изследванията показват, че тези продукти не са напълно биологично неутрални и при определени условия могат да индуцират слабо изразени генотоксични изменения в клетките - растителни и човешки, което подчертава необходимостта от оценка на тяхната екологична безопасност. Получените резултати предполагат възможности за оползотворяването и приложението на отпадните води, като същевременно биха допринесли за намаляване на отпадъчния товар върху околната среда (Г8: публ. 16).

Генопротективен потенциал на хидрозоли, масла, отпадни води

- За намаляване на ДНК увреждащото действие на различни генотоксини и защита на генома на клетките се прилагат разнообразни стратегии. Една от тях е и използването на растителни екстракти, масла и други продукти от растителен произход, като в изследванията се прилагат подходящи експериментални схеми. Проучен е генопротективният ефект на различни продукти от *Rosa* spp. (хидрозоли, етерични масла, субкритични водни екстракти и отпадни води) спрямо директно действащия мутаген N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine (MNNG). При третиране проведено по подходящ експериментален дизайн е наблюдаван добре изразен защитен потенциал на използваните продукти от рози, при който е редуцирано нивото на MNNG -индуцираните хромозомни аберации и микроядра, в редица случаи над два пъти, както и частично се възстановява митотичната активност, като степента на ефекта зависи от вида продукт, концентрацията и експерименталната схема на третиране (B4: публ. 2, 3, 6; Г8: публ. 16).
- Хидрозолите от *Rosa damascena* Mill., *Rosa centifolia* L. и *Rosa gallica* L. проявяват изразен генопротективен ефект, като при различни схеми на третиране се отчита намаляване на цитотоксичните и генотоксичните ефекти на директния мутаген MNNG, включително редукция на хромозомните аберации и микроядрата, както и възстановяване на митотичната активност (B4: публ. 2, 3).
- Субкритичните водни екстракти от *R. damascena* Mill. и *R. alba* L. показват добре изразен защитен ефект спрямо MNNG при *in vivo* и *in vitro* тест-системи, като приложени в нетоксични концентрации намаляват честотата на генетичните

увреждания приблизително 2-3 пъти, като защитният потенциал епо-силно изразен за екстракта от *R. damascena* (B4: публ. 6).

- Етеричните масла и отпадните води от водно-парната дестилация на *Rosa alba* L., приложени в подходящи експериментални схеми на третиране с генотоксин, също проявяват генопротективна активност, което вероятно е свързано с наличието на антиоксидантни и радикал-улавящи съединения (Г8: публ. 16).

2. Цитогенетичен скрининг на новосинтезирани аминоксифонати и техни производни (Г7: публ. 1, 2, 5, 7-11)

Новосинтезираните аминоксифонати и техни производни представляват важен клас биологично-активни съединения, характеризиращи се с широк спектър на фармакологична активност, включително изразен противотуморен потенциал. Това обуславя необходимостта от предварителна цитогенетична оценка на кластогенната и антипролиферативната им активност в нормални соматични клетки *in vivo* като ключов елемент от скрининга за биологична безопасност и селекция на молекули-кандидати за последващи експериментални проучвания. Анализите на резултатите за ефекта на тези би било добра база за разработване на нови противотуморни агенти и полимерни лекарствени форми.

- Чрез *in vivo* цитогенетичен анализ на костномозъчни клетки от лабораторни мишки (линия С57В1) е проучена кластогенната и антипролиферативната активност на широк спектър аминоксифонатни производни - α -аминоксифонове киселини (Г7: публ. 1), производни на N-(ксифонометил)глицин (Г7: публ. 2), фуран-съдържащи аминоксифонати (Г7: публ. 5), антрацен-съдържащи аминоксифонати и Schiff бази (Г7: публ. 7, 8), бис-аминоксифонати (Г7: публ. 9), поликсифоестери (Г7: публ. 10) и полимерни производни (Г7: публ. 11) в дози 10 и 100 mg/kg телесно тегло.

За α -аминоксифонове киселини и производните на N-(ксифонометил)глицин е извършена една от първите системни *in vivo* оценки на генотоксичната и антипролиферативната им активност (Г7: публ. 1, 2).

- Установено е, че изследваните съединения в повечето случаи проявяват ниска до умерена кластогенна активност *in vivo* (Г7: публ. 1, 2, 5, 7-11), като честотата на хромозомните аберации е статистически значимо повишена спрямо негативната контрола, но остава съществено по-ниска от тази при митомицин С. Преобладават центромерни сливания, докато хромозомните разкъсвания и фрагменти са представени в по-ниска честота, което насочва към селективно увреждане на центромерните региони при запазване на общото количество хромозомен материал. При фуран-съдържащите производни (Г7: публ. 5) честотата на аберациите остава в нисък диапазон (приблизително 2,5-5,8%), а при антрацен-съдържащите съединения и Schiff бази (Г7: публ. 7, 8) преобладават Робертсонови транслокации, което предполага ограничено нарушение на геномната стабилност. Така общият кластогенен ефект се определя като умерен и значително по-слаб в сравнение с положителната контрола митомицин С.

- При част от съединенията е наблюдавана дозозависима тенденция към увеличаване на честотата на аберантните митози (напр. при бис-аминофосфонати и полифосфоестери - Г7: публ. 9, 10), докато при други (α-аминофосфонови киселини и производни на N-(фосфонометил)глицин - Г7: публ. 1, 2) липсва ясно изразена зависимост доза - ефект, което подчертава ролята на структурните особености на молекулите за цитогенетичната изява.
- Оценката на митотичната активност на костномозъчните клетки показва умерен антипролиферативен ефект при всички изследвани групи съединения (Г7: публ. 1, 2, 5, 7-11), като потискането на митотичния индекс е по-слабо изразено в сравнение с това, установено за митомицин С.В отделни случаи митотичният индекс се понижава до около 60-65% от контролните стойности, без пълно потискане на клетъчното делене. По-силно изразен антипролиферативен ефект се наблюдава при някои нискомолекулни съединения (напр. фуран- и антрацен-съдържащи – Г7: публ. 5, 7), докато при полимерните производни (Г7: публ. 10, 11) ефектът е по-умерен, което показва по-ниска токсичност към нормалните клетки. Това съответства на наблюдаваната по-ниска цитотоксичност на полимерните аналози спрямо нискомолекулните съединения.
- Съпоставянето на цитогенетичните и *in vitro* данните показва структурно обусловени различия в биологичната активност на изследваните съединения. Структурни модификации като фуранови, антраценови и полимерни фрагменти водят до различна степен на генотоксичност, антипролиферативен ефект и антитуморна активност. При значителна част от аминоксифосфонатите и техните аналози е установено съчетание между добре изразена антитуморна активност *in vitro* и сравнително ниска генотоксичност *in vivo* (Г7: публ. 2, 5, 7-11), най-ясно демонстрирано при фуран-съдържащите производни (Г7: публ. 5), антрацен-съдържащите съединения (Г7: публ. 7-9) и полифосфоестерите (Г7: публ. 10).

3. Цитогенетичен скрининг на индустриални химични агенти и органични разтворители (Г7: публ. 14).

В рамките на сравнително *in vivo* цитогенетично проучване е оценен генотоксичният потенциал на индустриалния органичен разтворител тетрахидрофуран (ТНФ) чрез анализ на хромозомни аберации и митотичен индекс в костномозъчни клетки от пет вида дребни гризачи – лабораторни мишки (линия ICR) и широко разпространени в България диви видове (*Apodemus flavicollis* (Melchior, 1834), *Mus spicilegus* (Petényi, 1882), *Clethrionomys glareolus* (Schreber, 1780) и *Microtus arvalis* Pallas, 1778)) (Г7: публ. 14). Получените данни доказват умерен *in vivo* кластогенен ефект на ТНФ, отчитат съществена междувидова вариабилност в чувствителността и показват по-висока реактивност на представителите на род *Mus*, особено *M. spicilegus*, което ги определя като подходящи модели за генетичен мониторинг в агроекосистеми. Установените различия между лабораторни и диви видове подчертават необходимостта от използване на повече от един животински модел при екотоксикологични изследвания и при екстраполация на резултатите към човека.

4. Екотоксикологични изследвания и оценка на генетичния риск при експозиция на тежки метали при диви и лабораторни дребни бозайници (Г7: публ. 12).

Замърсяването на околната среда с тежки метали представлява съществен екологичен проблем поради способността на тези замърсители да се акумулират в организмите и да предизвикват увреждания в ДНК и хромозомния апарат. Използването на дивни дребни бозайници като биоиндикаторни видове, както и на лабораторни животински модели, позволява да се оценят както реалното замърсяване в природни екосистеми, така и генотоксичните ефекти при контролирани експериментални условия. В този контекст са проведени изследвания, насочени към оценка на оловното натоварване във високопланински екосистеми чрез използване на дивни дребни бозайници като биоиндикатори.

- В рамките на съвместни изследвания с Института по високопланинска биология, Жилина, Словакия, е проведено сравнително екотоксикологично проучване на съдържанието на олово в костна тъкан на снежни полевки *Chionomys nivalis* (Martins, 1842) от високопланинските райони Татри, Витоша и Рила. Анализирано е съдържанието на олово в костната тъкан на възрастни индивиди, което позволява интегрирана оценка на регионалните различия в натрупването на този метал при естествени популации в различни алпийски екосистеми (Г7: публ. 12).
- Установени са съществени регионални различия в концентрациите на олово, като стойностите при популациите от Татрите са приблизително три пъти по-високи от тези при популациите от българските планини, докато между Рила и Витоша не са установени статистически значими различия. Получените данни потвърждават приложимостта на *Chionomys nivalis* като чувствителен биоиндикаторен вид за оценка на оловно замърсяване във високопланински екосистеми и подчертават значението на тези видове за проследяване на регионални различия в експозицията и биоаккумуляцията на тежки метали в природни условия (Г7: публ. 12).

Проучването разширява приложението на този модел в екотоксикологичните изследвания и допринася за по-прецизна оценка на екологичния риск, свързан с дългосрочната експозиция на олово във високопланински екосистеми.

5. Кариологични и сравнителни цитогенетични изследвания (Г7: публ. 3, 4)

Получени са първични кариологични данни за българската автохтонна порода Каракачанско куче (*Canis familiaris*, L. 1758) чрез кариологичен и сравнителен цитогенетичен анализ, насочен към характеризиране на хромозомния набор и съпоставянето му със стандартния кариотип на вида.

- Оптимизиран е подход за получаване на метафазни пластинки от костномозъчни клетки, приложим при кариологични изследвания на кучета без съществено нарушаване на жизненото състояние на животните. Установено е, че всички изследвани индивиди притежават стандартен диплоиден набор $2n = 78$ (38 двойки акроцентрични автозоми и нормална конфигурация на половите хромозоми - XX/XY), без отклонения в броя и морфологията на хромозомите и без полово-хромозомни анеуплоидии, което потвърждава кариотипната стабилност и съответствието със стандартния кариотип на *Canis familiaris* (Г7: публ. 3, 4). В част от анализираните метафазни пластинки са наблюдавани единични структурни хромозомни аберации (разкъсвания и фрагменти), както и

полиплоидни клетки, които могат да бъдат интерпретирани като резултат от възрастови особености и/или въздействие на фактори на средата с потенциален генотоксичен ефект, а не като белег на специфична кариотипна нестабилност на породата (Г7: публ. 3). Поради ограничения брой сравнителни данни за морфологично и географски близки породи не могат да се формулират окончателни изводи за специфични кариологични различия. Получените резултати представляват първична цитогенетична характеристика на породата и създават основа за бъдещи сравнителни, селекционни и консервационни изследвания, насочени към съхраняване и научно обоснована оценка на генетичните ресурси на автохтонните породи в България.