

**СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ
“СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ**

БЪЛГАРИЯ, 1164 София,
Бул. “Драган Цанков” № 8
Тел./Факс: 02 / 865 66 41



**UNIVERSITY OF SOFIA
“ST. KLIMENT OHRIDSKI”
FACULTY OF BIOLOGY**

Dr. Tzankov Blvd. № 8
1164 Sofia, BULGARIA
Tel./Fax: +359 2 865 66 41

МАРТИН ДИМИТРОВ ДИМИТРОВ

**АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ НА ПЧЕЛНИ
ПРОДУКТИ И ВЛИЯНИЕТО ИМ ВЪРХУ ПОДВИЖНОСТТА
НА ТУ1 РЕТРОТРАНСПОЗОН В ДРОЖДИ
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

АВТОРЕФЕРАТ
на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен
„ДОКТОР”

СОФИЯ

2013

**СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ
“СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ**

БЪЛГАРИЯ, 1164 София,
Бул. ”Драган Цанков” № 8
Тел./Факс: 02 / 865 66 41



**UNIVERSITY OF SOFIA
“ST. KLIMENT OHRIDSKI”
FACULTY OF BIOLOGY**

Dr. Tzankov Blvd. № 8
1164 Sofia, BULGARIA
Tel./Fax: +359 2 865 66 41

МАРТИН ДИМИТРОВ ДИМИТРОВ

**АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ НА ПЧЕЛНИ
ПРОДУКТИ И ВЛИЯНИЕТО ИМ ВЪРХУ ПОДВИЖНОСТТА
НА ТУ1 РЕТРОТРАНСПОЗОН В ДРОЖДИ
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна
степен
„ДОКТОР”

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:

доц д-р Маргарита Пешева

ОФИЦИАЛНИ РЕЦЕНЗЕНТИ:

проф д-р Любомир Стоилов
доц д-р Благовеста Гочева

София
2013

ДНК	дезоксирибонуклеинова киселина
кДНК	копи ДНК
мтДНК	митохондриална ДНК
РКВ	реактивни кислородни видове
РНК	рибонуклеинова киселина
яДНК	ядрена ДНК
Ty	transposon yeast

ИЗПОЛЗВАНИ ГЕННИ СИМВОЛИ

<i>SCO1</i>	ядрен ген, участващ в митохондриалното окислително фосфорилиране
<i>SEC53</i>	Ген, определящ гликозилирането на манани от клетъчната стена
<i>URA3</i>	Ген, участващ в синтеза на урацил
<i>YAP1</i>	Главен ген за контрол на количеството на пероксидите

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Дрождите *S.cerevisiae* са едноклетъчни еукариоти и имат много предимства пред многоклетъчните организми. Те са непатогенни, могат бързо да растат на дефинирани и евтини хранителни среди, имат кратко генерационно време (90 минути в богатата среда и 2,5 часа - на минимална) и съществуват стабилно в хаплоидно и диплоидно състояние. Дрождите са подходяща моделна система за изучаване на сложни молекулярно-биологични процеси, протичащи в живите клетки, като сигнална трансдукция, механизми на регулация на клетъчното делене и клетъчния цикъл, клетъчната адаптация и много други.

Дрождите имат малък и компактен геном (16 хромозоми, 12 000 kb), който съдържа 6000 отворени рамки на четене. Между гените има малко некодиращи последователности, като спейсърна ДНК, псевдогени, интрони. Подвижните генетични елементи заемат около 2,4 % от генома на дрождите и се обозначават като Ту транспозони (от Ту1 до Ту5). Най-големият клас Ту елементи са дрождените Ту1 ретротранспозони. Подобно на ретровирусите Ту1 ретротранспозоните се преместват от едно място на друго в дрождения геном, чрез обратна транскрипция на РНК-междинен продукт.

Ту1 транспозицията може да причини различни изменения в генома на дрождите, като инсерции, делеции, инверсии на големи ДНК фрагменти. Получените ДНК-повреди от своя страна също могат да активират Ту1 подвижността. Тя зависи от функцията на гена RAD-9, който е функционален хомолог на човешкия тумор-супресорен ген p53. Сходството в структурата и функциите на някои дрождени гени, хомоложни с тези на човека, прави възможно изучаването на механизмите на възникване на редица човешки заболявания.

Известно е, че спонтанната честота на Ту1 транспозицията е сравнително ниска, но тя значително може да бъде увеличена под действие на различни стресови фактори, като UV-лъчи, йонизираща радиация, химични мутагени, температурен и осмотичен шок, азотен дефицит, други генератори на реактивни кислородни видове (РКВ).

РКВ могат да възникнат и в резултат на нормалния клетъчен метаболизъм. В неделящи се клетки, РКВ са старателно регулирани метаболити, които участват като сигнални трансдуктори и провеждат информация, необходима за осъществяване на клетъчния редокс-баланс. При нарушаване на баланса между произведени и обезвредени РКВ настъпват сериозни промени в биомолекулите, включително и в ДНК. Възникналите РКВ под действие на екзогенни и ендогенни източници, могат да блокират действието на различни гени и транскрипционни фактори. Една от многото последици за дрождевите клетки е и увеличената Tu1 транспозиция.

В отговор на разрушителното действие на РКВ, аеробните организми са си изградили различни защитни механизми, чиято цел е да предпазват клетъчните компоненти от увреждания. В научната литература е описан голям брой природни и синтетични вещества, които могат да неутрализират действието на РКВ. Тези вещества имат доказано антиоксидантно действие, което се дължи на съдържащите се в тях флавоноиди, феноли, α -токоферол, пероксидаза, каталаза, витамини и други (Lotfy, 2006). Доказано е, че пчелните продукти (мед, прополис и пчелно млечице) притежават силно антиоксидантно, противовъзпалително и противотуморно действие (Nagai et al., 2001).

Още от древността прополисът е използван широко в народната медицина за лечение на различни заболявания (Khalid et al., 2001). За него е доказано, че има противовъзпалителни, бактериостатични, антинеопластични и антиоксидантни свойства (Kumazawa et al., 2004). Затова и сега прополисът се изследва в много страни по света. Съществуват няколко вида прополис, различаващи се по химичен състав и фармакологични свойства (Bankova, 2000, 2009). В повечето от тях е доказано наличие на флавоноиди и терпени, които имат силен ефект при „гасенето” на свободните радикали (Furusawa et al., 2005).

От средата на 1990-те години досега интензивно се изследват антиоксиданти с различен произход. Една от най-съществените причини за това е натрупването на доказателства за причинна взаимовръзка между оксидативен стрес и канцерогенеза.

Увеличеният интерес към ролята на свободните радикали в патогенезата на болестните състояния у човека и ползата от консумация на храни с антиоксидантни свойства доведе до необходимостта от създаване на методи за измерване на антиоксидантна активност на различни природни продукти. Съществуват десетки *in vivo*, клетъчни (*cell-based*) и *in vitro* тестове, някои от които са автоматизирани от фармакологични компании.

Не всички субстанции с редуциращи свойства в химични реакции са антиоксиданти. Такива са само тези, които могат да навлизат в живи клетки и да предпазват биологичните мишени от въздействието на РКВ (Реактивни Кислородни Видове, ROS) и да отговарят на критериите за антиоксидантно действие. Изследванията стават още по-строги, когато се анализира биологичният ефект на един антиоксидант. Освен свойството на антиоксиданта да преодолее пермеабилитетната бариера на клетъчната стена, трябва да се има предвид изключителната реактивоспособност и краткия полуживот на РКВ, синтезирани в клетките. Това прави безмислено определянето на биологичната антиоксидантна активност в клетъчни лизати, екстракти и други. Друго важно изискване при определяне биологичната активност на един антиоксидант е метаболизмът му в живата клетка и факта, че в някои случаи носител на антиоксидантна активност не е субстанцията в изследвания продукт, а нейн метаболит. Въпреки големия брой публикувани тестове, само в единични случаи са изпълнени и то само някои от изискванията. По тези причини, необходимостта от създаване на нови тестове, удовлетворяващи възможно голям брой от изискванията към метод за определяне на биологичната активност на антиоксиданти е голям.

В дисертацията е описан такъв тест, наречен Ту1антиРКВ и са представени получените с него резултати от определяне на антиоксидантна активност на пчелни продукти, произведени в България. Изследването на тези продукти показва, че маханизмът, по който антиоксиданта неутрализира оксидативните радикали в живата клетка, се отличава от механизма на химичните реакции,

използвани в другите тестове за определяне на антиоксидантна активност.

II.. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

От прегледа на литературния обзор се вижда, че голяма част от природните продукти, включително и пчелни, проявяват различни биологични активности. Това ни даде основание да изберем и целта на нашата работа, която се свежда до изследване на антиоксидантен и антиканцерогенен ефект на прополис , пчелно млечице и мед върху дрожди *Saccharomyces cerevisiae*.

За постигането на целта си поставихме следните задачи:

- Разработване на тест на моделна система дрожди, която да различава канцерогени от мутагени без канцерогенен ефект
- Разработване на тест за определяне на зависимостта между нивото на индуцирани от канцерогени РКВ и честотата на Tu1 транспозицията.
- Изследване на антиоксидантната активност на прополис, пчелно млечице и мед по отношение нивото на Tu1-транспозиция, индуцирани от CrVI в дрожди *S.cerevisiae rho⁺*.
- Изследване на антиоксидантната активност на прополис, пчелно млечице и мед по отношение нивото на Tu1-транспозиция, индуцирани от MMS в дрожди *S.cerevisiae rho⁺*.
- Изследване на антиоксидантната активност на прополис по отношение нивото на Tu1-транспозиция, индуцирани от MMS и H₂O₂ в дрожди *S.cerevisiae rho⁻*.
- Изследване на антиоксидантната активност на прополис по отношение нивото на Tu1-транспозиция , индуцирани от MMS в дрожди *S.cerevisiae yap1Δ*.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

За осъществяване на научните експерименти в настоящата дисертация са използвани щамове дрожди от вида *Saccharomyces cerevisiae* (Табл. 1).

В настоящата работа са използвани: MMS (methyl methanesulfonate), 99%, от фирма Sigma-Aldrich; Cr VI (хромен анхидрид) – от Difco, производител – Реахим; H₂O₂ (водороден пероксид), от фирма Sigma-Aldrich, ХТТ (2,3-бис(2-метокси-нитро-5-сулфофенил)-5-(фенил-амино)-карбонил-2Н-тетразоленхидроксид) – от Sigma-Aldrich;

Таблица 4. Използвани щамове дрожди

Щам	Генотип	Източник
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
551 (DG1141ts1)	МАТ α , <i>ura3</i> , <i>his3</i> Δ 200: <i>TumHis3AI</i> , <i>sec53</i>	Pesheva et al., 2005
Rho-	съдържа делеция в мтДНК на съответния щам	
551rho-	МАТ α , <i>ura3</i> , <i>his3</i> Δ 200: <i>TumHis3AI</i> , <i>sec53</i> , rho-	Настоящата дисертация
<i>Yap1</i> Δ	МАТ α , <i>ura3</i> , <i>his3</i> Δ 200: <i>TumHis3AI</i> , <i>sec53</i> , <i>yap1</i> Δ	Настоящата дисертация

Антиоксиданти:

- Прополис – любезно предоставен от проф. д-р В. Банкова, Институт по органична химия с център по фитохимия, БАН;

- Пчелен мед

- Пчелно млечице – любезно предоставени от доц. д-р Петър Богданов Вачев от Института по животновъдни науки, Костинброд

Използвани са различни методи: микробиологични (спектрофотометрично измерване на плътността на клетъчната култура), молекулярно (получаване на *rho*⁻ мутанти), молекулярно

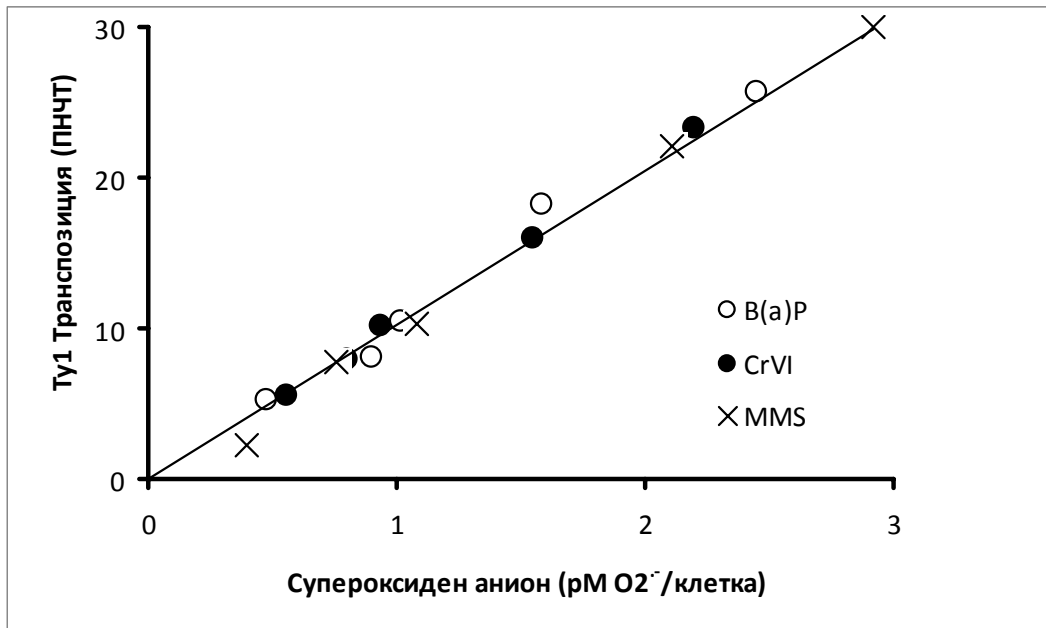
генетични (количествен *Ty1* транспозиционен тест), биохимични (измерване количеството на супероксидните аниони в клетки *S. cerevisiae*) и статистически, които са описани подробно в дисертацията. Щам *Saccharomyces cerevisiae* 551 *rho*⁺, използван като опитен в *Ty1*антиРКВ теста, е депониран в Сбирка към Национална банка за микроорганизми, с каталожен № 8719 от 19. 04. 2011 г.

IV. РЕЗУЛТАТИ

IV.1. Пропорционална зависимост между честотата на *Ty1* транспозицията и нивото на РКВ в клетки *S.cerevisiae*

Честотата на *Ty1* транспозицията се увеличава след третиране на дрождени клетки с канцерогени, но остава непроменена при третиране с неканцерогенни мутагени. Установихме, че причината за селективния ефект на канцерогените върху *Ty1* транспозицията е тяхната способност да произвеждат РКВ. Доказано бе, че канцерогените са силни генератори на РКВ в дрожди, а повишеното ниво на РКВ е инициатор на *Ty1* транспозиция. Неканцерогенните мутагени са слаби генератори на РКВ и третирането на дрожди с такива генотоксини не повлиява транспозицията на *Ty1* транспозона.

Детайлното изследване за зависимостта мажду *Ty1* транспозиция и ниво на РКВ показва, че мобилността на *Ty1* транспозона зависи правопрпорционално от нивото на РКВ, индуцирани от канцерогени. На Фигура 1 е показана линейната зависимост между *Ty1* транспозиция (ПНЧТ) и количеството супероксидни аниони ($O_2^{\cdot-}$), индуцирани от шествалентен хром (CrVI), метилметансулфонат (MMS) или бензо(а)пирен (B(a)P). Същата зависимост бе установена и при използване на 3 други канцерогени като индуктори на РКВ.



Фигура 9. Активиране на Ту1 транспозицията от нивото на pM O₂⁻ /клетка; Бензо(а)пирен (B(a)P), шествалентен хром (CrVI), метилметан сулфонат (MMS)

Определена честота на Ту1 транспозиция изисква определено ниво на РКВ, независимо с какъв канцероген е индуцирана продукцията им. Например, нарастване на честотата на транспозиция в пъти (ПНЧТ) = 10 се постига от ниво на РКВ, отговарящо на супероксиден анион (O₂⁻) = 1,0 pM/клетка, то тези стойности се индуцират след третиране с 5 mM CrVI, 12mM MMS или 0,16 mM B(a)P.

Установената превопропорционална зависимост между честотата на Ту1 транспозицията и нивото на РКВ, произведени в клетки *S.cerevisiae* подсказва идеята за създаване на тест за определяне на антиоксидантна активност на природни продукти (и не само) по инхибиране на честотата на Ту1 транспозицията.

IV.2. Ту1антиРКВ тест за количествено определяне на антиоксидантна активност.

Тестът Ту1антиРКВ е базиран на клетки *S.cerevisiae*, в който за определяне на антиоксидантна активност се използва промяната в един клетъчен процес, какъвто е Ту1 транспозицията. Във всички други *in vitro* или клетъчни тестове антиоксидантната активност се определя посредством химични реакции.

Опитният щам *S.cerevisiae* 551 е конструиран чрез генноинженерни методи и съдържа 1) локус, представляващ маркиран Ту1 транспозон, чрез който честотата на Ту1 транспозицията се измерва количествено, 2) мутантен алел *sec53*, увеличаващ пермеабилитета на клетките *S.cerevisiae* (по принцип те се характеризират със здрава и непропусклива за различни вещества клетъчна стена) и 3) *rho*⁺ генотип (клетките са с нормални митохондрии), осигуряващ активна функция на митохондриалното окислително фосфорилиране, което е източник на РКВ при дрожди.

Тестът Ту1антиРКВ се състои в следното. Опитните клетки в експоненциална фаза на разтеж се третират с антиоксидант, а нивото на РКВ в тях се повишава чрез третиране с канцероген. Увеличените нива на РКВ индуцират Ту1 транспозиция пропорционално с количеството на РКВ, останали неунищожени от антиоксиданта. Изследването на няколко концентрации от антиоксиданта позволява стойностите за получената честота на Ту1 транспозицията да се отнасят в координатна система спрямо концентрацията на изследвания антиоксидант. От получената зависимост се определя IC₅₀-концентрацията на антиоксиданта, водеща до 50% инхибиране на Ту1 транспозицията. В това се състои принципната разлика между Ту1антиРКВ теста и всички други тестове – с него активността на антиоксидантите (IC₅₀) се определя посредством **измерване на един клетъчен процес**-Ту1 транспозиция. Във всички други тестове антиоксидантната активност се измерва в химични реакции, които нямат нищо общо с физиологията на клетката.

Предимства на теста Ту1антиРКВ се свеждат до това, че той:

1) дава **количествена оценка** на антиоксидантната активност в сравнение с оценката, получена в други тестове

2) определя антиоксидантната активност само в **живи клетки**

3) определя активността на антиоксиданта спрямо РКВ, **които са физиологично активни**, т.е. осъществяващи Tu1 транспозиция. Останалите тестове определят антиоксидантна активност спрямо всички РКВ в клетката, назависимо от функционалния им статус.

Недостатъците на теста Tu1антиРКВ се състоят в това, че той:

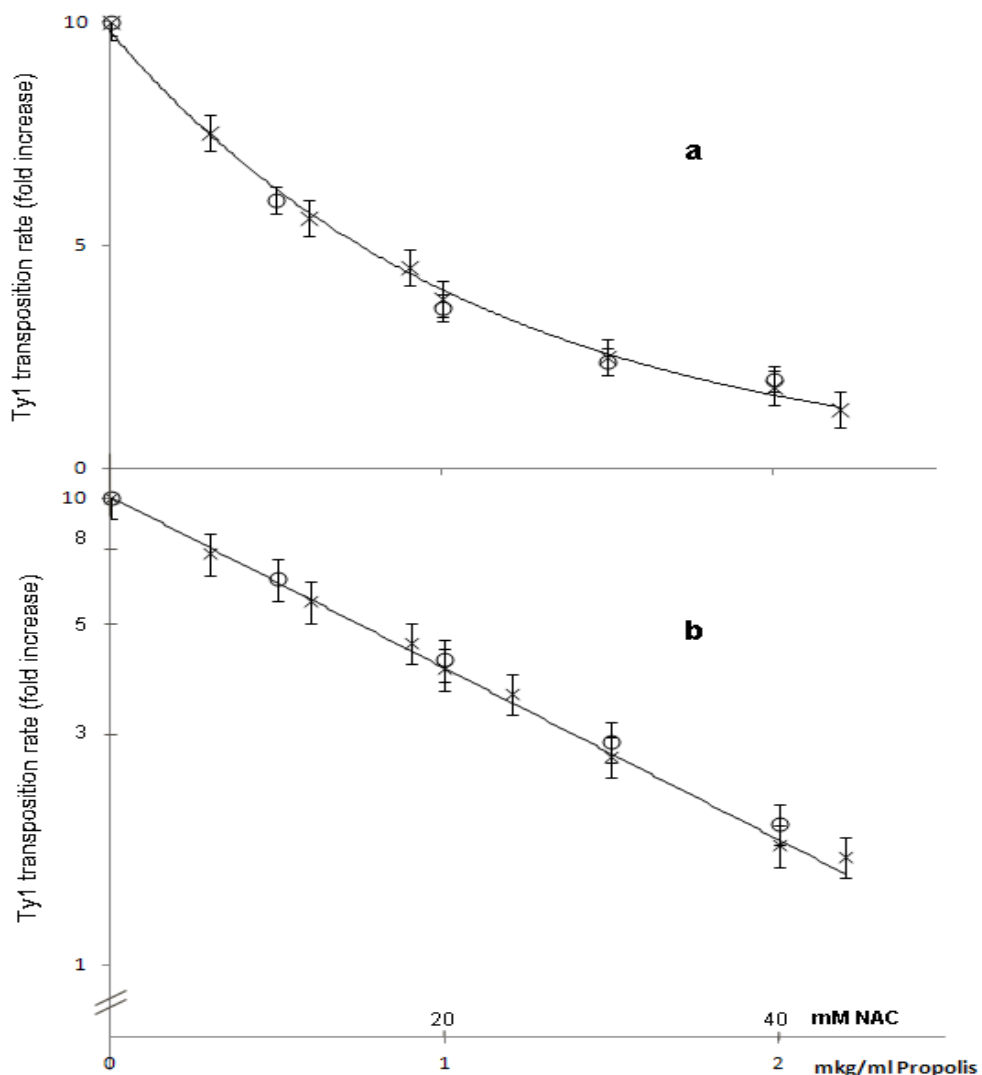
1) е бавен и резултатите се отчитат на 6-тия ден

2) не е автоматизиран

3) като индуктори на РКВ се използват канцерогени, които са опасни за човешкото здраве

IV.3. Антиоксидантна активност на пчелни продукти определена с Tu1антиРКВ теста

Тестът Tu1антиРКВ беше използван за определяне на антиоксидантната активност на пчелни продукти, произведени в България. Получени бяха различни стойности за IC₅₀ (това е количеството проба (мкг/мл, мг/мл за екстракти; мкМ, mM за чисти субстанции), инхибиращо 50% от Tu1 транспозицията в Контрола 2-с канцерогена), като за прополис IC₅₀ е 0,7 мкг/мл, за пчелно млечице -10 мкг/мл и за пчелен мед -250 мкг/мл. Получените еднакви стойности за IC₅₀, при използване на CrVI (5mM) или MMS (12mM) като индуктор на РКВ показва, че резултатът от Tu1антиРКВ теста не се повлиява от източника на РКВ. Типичният резултат, получаван с изследваните пчелни продукти (в конкретния случай с прополис) е илюстриран на Фигура 2a и 2b.



Фигура 2. Ty1 антиРКВ тест с прополис

Зависимостта между антиоксидантната активност на прополис (представена като ПНЧТ) и концентрацията му дава една крива в метрична координатна система (Фигура 2a), която се трансформира в права линия при смяна скалата на ординатата от метрична в логаритмична (Фигура 2b). Подобна експоненциална зависимост между антиоксидантната активност и концентрацията на пчелното млечице и пчелния мед беше установена в

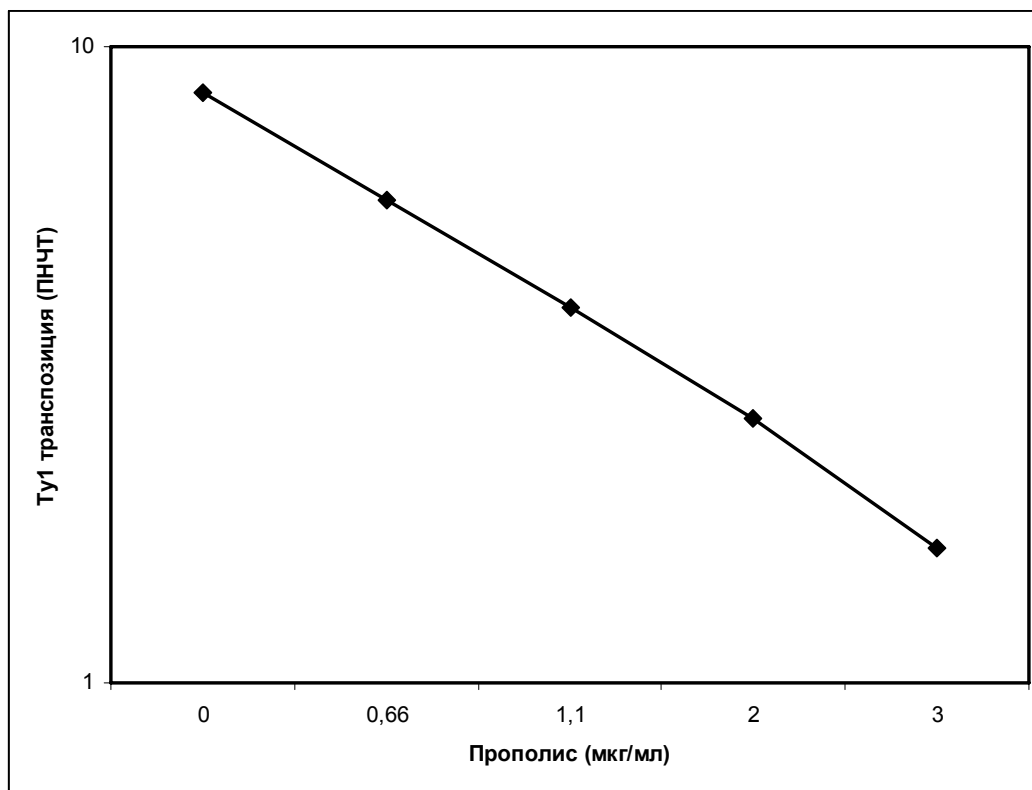
Ту1антиРКВ теста, в който като индуктори на РКВ бяха използван CrVI или MMS. Получените резултати ни дават основание да предположим, че експоненциалната зависимост не се дължи на природата на пчелните продукти, защото при изследване на антиоксидантния ефект на N-ацетилцистеин (лабораторен антиоксидант) също се получава експоненциална зависимост между Ту1 транспозицията и концентрацията му (Фигура 2b). В известните досега тестове между антиоксидантната активност и концентрация на антиоксиданта е намерена правопрпорционална зависимост, то получената експоненциална зависимост характеризира Ту1антиРКВ теста и най-вероятно се дължи на биологичния механизъм, по който се определя антиоксидантната активност в него, т.е. използването на клетъчен процес, а не на химична реакция.

IV.4. В Ту1антиРКВ теста зависимостта активност към концентрация на антиоксиданта е експоненциална

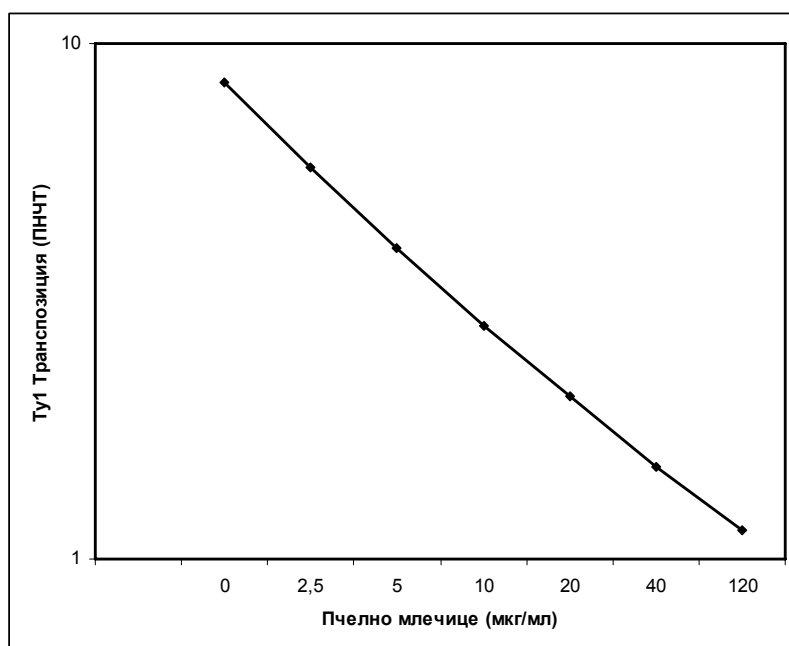
При всички опити за определяне на антиоксидантна активност с различни методи, много важен показател за точността и механизма на използвания метод представлява зависимостта между активност на антиоксиданта и неговата концентрация. Така, при всички *in vitro* методи тази зависимост трябва да бъде пропорционална, защото механизмът на *in vitro* тестовете е стехиометрично взаимодействие между оксидант и химикал с антиоксидантни свойства. При клетъчните антиоксидантни тестове, които представляват всъщност *in vitro* тестове проведени в живи клетки, литературните данни също показват линейна пропорционална зависимост между активност и концентрация на антиоксиданта изследваните продукти са прополи, като в един от случаите с пчелно млечице и пчелен мед.

Детайлното изследване на прополис, пчелно млечице и мед посредством Ту1антиРКВ теста не показва пропорционална зависимост между антиоксидантна активност и концентрация. Такова отсъствие на пропорционалност се наблюдава при провеждане на теста както с CrVI, така и с MMS, което означава, че

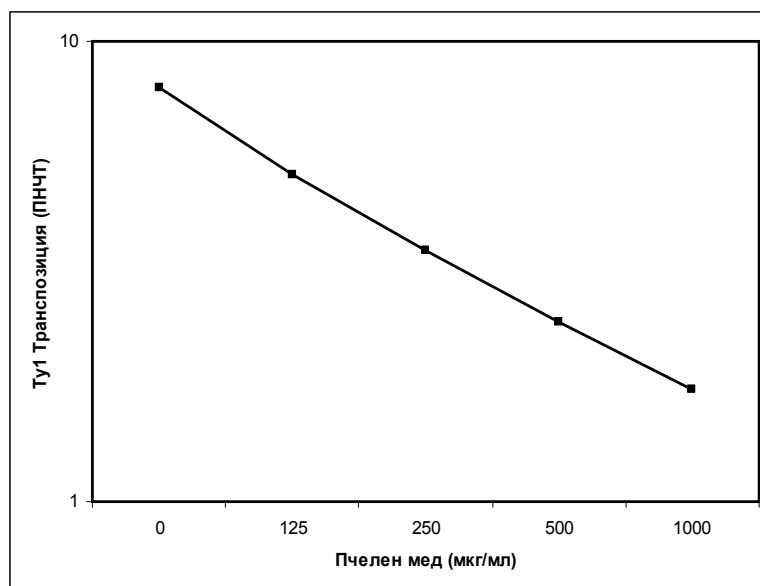
получената нетрадиционална зависимост е атрибут на Ту1 антиРКВ теста. Във всички варианти тази зависимост се демонстрира с крива линия, наподобяваща по-скоро експоненциална зависимост, а не пропорционалност. между концентрация и активност. Ако резултатите се нанесат на координатна система, в която ординатата е логаритмична (а не метрична), то зависимостта между антиоксидантната активност и концентрация се представя с права линия, която е низходяща при увеличаване на концентрацията на антиоксиданта (Фигури 3, 4, 5, 6, 7, 8,).



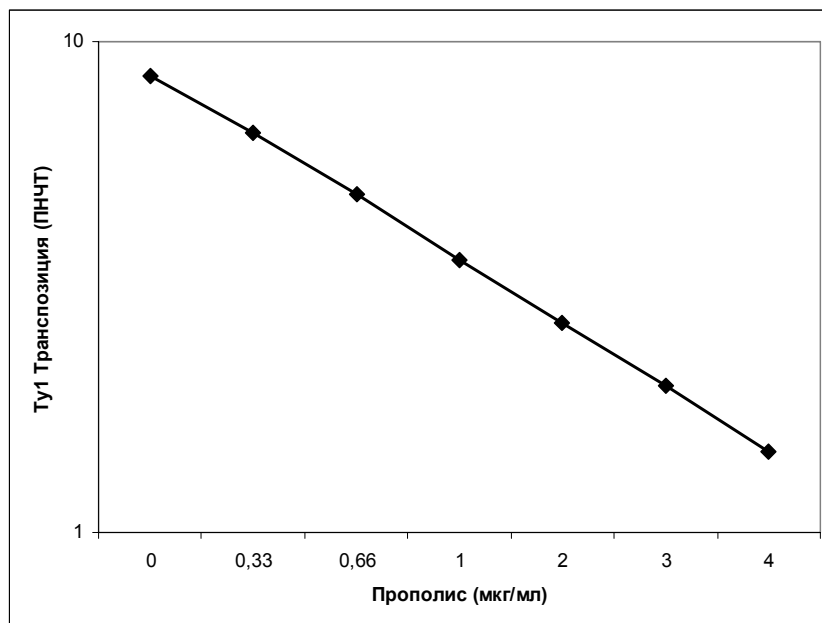
Фигура 3. Индукция на Ту1 транспозиция след третиране с прополис и CrVI



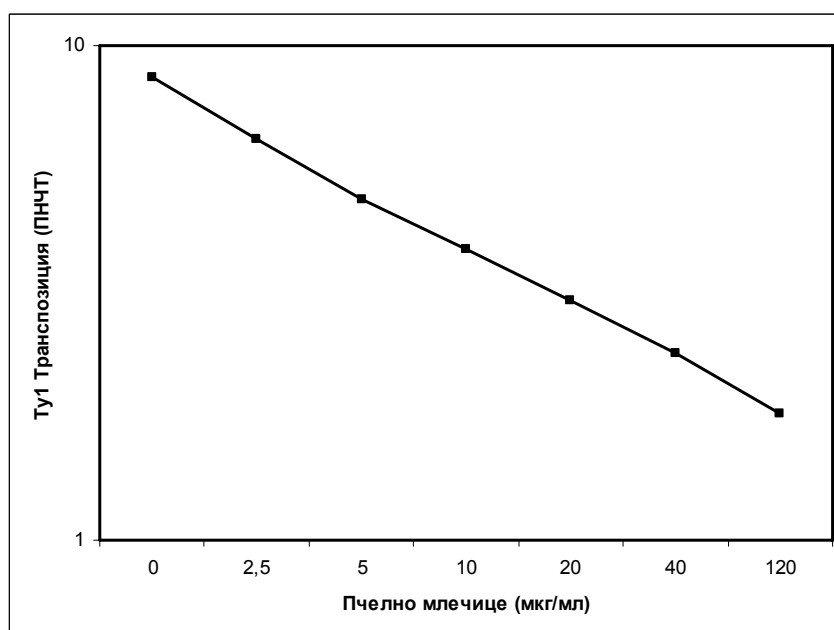
Фигура 4. Индукция на Tu1 транспозиция след третиране с пчелно млечице и CrVI



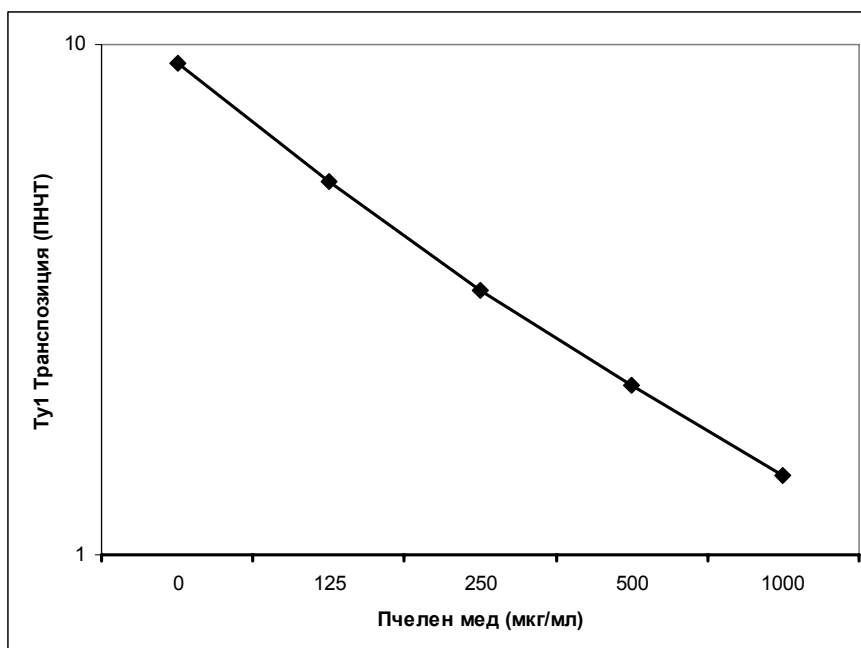
Фигура 5. Индукция на Tu1 транспозиция след третиране с пчелен мед и CrVI



Фигура 6. Индукция на Tu1 транспозиция след третиране с прополис и MMS



Фигура 7. Индукция на Tu1 транспозиция след третиране с пчелно млечице и MMS



Фигура 8. Индукция на Tu1 транспозиция след третиране с пчелен мед и MMS

Тази линейна зависимост, получена при логаритмична скала на ординатата доказва, че зависимостта между антиоксидантната активност и концентрация е експоненциална. За разлика от пропорционалната зависимост, при която би имало равностойност в промяната на активност и концентрация, при експоненциалната зависимост промяна на концентрацията, например с 1 единица, води до промяна на активността с повече от 1 единица, например с 2 или 3 и т.н. В конкретния случай с Ту1антиРКВ теста това означава, че увеличаване концентрацията на антиоксиданта с 1 единица (абциса) води до намаляване на РКВ (т.е. на Tu1 транспозиция на ордината) с повече от 1 единица. Накратко, получените резултати показват, че при използване на Ту1антиРКВ теста, прополисът, пчелното млечице и медът проявяват по-голяма активност за неутрализиране на РКВ, отколкото същите продукти, изследвани с други клетъчни тестове, при които получената зависимост между активност и концентрация е пропорционална. Тази съществена разлика между Ту1антиРКВ

теста и други клетъчни тестове се проявява и в стойностите на IC_{50} , получени с тях. По-високата активност дава по-ниски стойности на IC_{50} и обратно, по-ниска активност води до по-високи стойности на IC_{50} . Получените с Ту1антиРКВ теста IC_{50} стойности са: прополис 0,7 мкг/мл, пчелно млечице 10 мкг/мл и мед 250 мкг/мл, докато в клетъчния тест, базиран на невроганглини клетки IC_{50} за прополис е 0,96 мкг/мл, а за пчелно млечице и мед стойностите са по-високи от предела на чувствителност на теста.

IV.5. Молекулен механизъм на Ту1антиРКВ теста

Във всички получени резултати за определяне на антиоксидантна активност на пчелни продукти с Ту1антиРКВ теста, зависимостта между антиоксидантната активност (мерена като понижаване на Ту1 транспозицията) и концентрацията на антиоксиданта (прополис, пчелно млечице, мед) дава НЕ пропорционална, а **ЕКСПОНЕНЦИАЛНА** зависимост. Контролният опит с НАС (използван вместо пчелен продукт, виж глава 5), доказва че тази експоненциална зависимост не се дължи на активирания от пчелните продукти метаболизъм на тестерните клетки, а на антиоксидантния им потенциал. Затова, се поставя въпроса за съществуване на молекулен механизъм на Ту1антиРКВ теста, който е принципно различен от този на публикуваните досега от други автори тестове за антиоксидантна активност. В следващото изложение са описани опити, които целят изясняване на този механизъм.

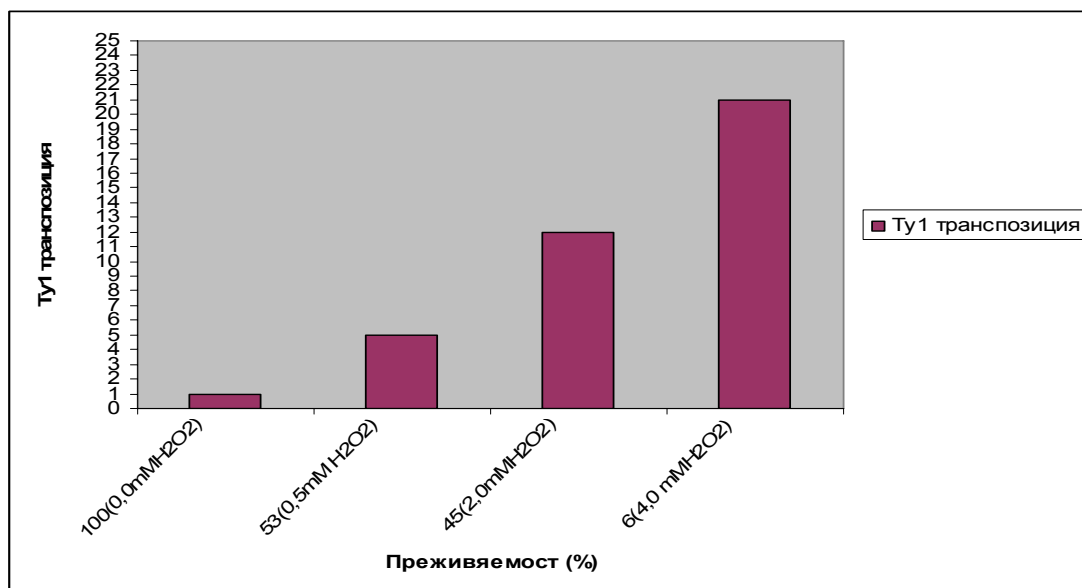
Принципната разлика между нашия тест и останалите тестове е начина, по който нивото на РКВ се повишава в опитните клетки: докато в Ту1антиРКВ теста, РКВ се продуцират в клетките, в останалите тестове РКВ се прибавят чрез H_2O_2 като химикал.

За изследване ефекта на H_2O_2 използвахме rho^- мутанти, получени чрез третиране на дивите rho^+ клетки на *S.cerevisiae* с етидиев бромид. Етидиевият бромид е интеркалиращ агент, който се вмъква между азотните бази в мтДНК. Вмъкването нарушава нормалното протичане на репликацията и е причина за възникване на делеции при следващата репликация на мтДНК. Получените

делеции обхващат винаги гените за окислителното фосфорилиране, а понякога и съседни на тях други гени. Затова във всички *rho*⁻ мутанти окислително фосфорилиране не протича. Това прави синтезата на РКВ в *rho*⁻ клетките невъзможна и литературни и наши данни показват, че РКВ практически отсъстват в *rho*⁻ мутанти.

Митохондриалната ДНК на дрождите *S.cerevisiae* кодира само 13 от белтъците, които изграждат комплексите на дихателната верига и окислителното фосфорилиране. Останалите белтъци, необходими за функционирането на митохондриите, се кодират от ядрени гени.

От резултатите в проведените до тук експерименти (глава 5) установихме правопрпорционална зависимост между количеството на РКВ, образувани в клетки *S.cerevisiae rho*⁺ от действието на канцерогени и честотата на Ty1 ретротранспозицията.



Фигура 9. Ефект на различни концентрации на прибавен H₂O₂ върху индукцията на Ty1 транспозиция и преживяемостта в *S. cerevisiae* 551 *rho*⁻, изразена чрез намаляване на честотата на транспозиция и повишаване на преживяемостта

Водородният пероксид (H_2O_2) е окислителен агент, който се отнася към групата на реактивните кислородни видове и участва в редица сигнални пътища. В присъствие на метални йони се редуцира частично, при което се образува хидроксилен радикал ($OH\cdot$), който е следващият РКВ продукт. В клетката каталазата прекъсва синтеза на $OH\cdot$, като превръща H_2O_2 във вода и по този начин неутрализира оксидативния стрес.

Редица изследвания показват, че H_2O_2 преминава свободно през клетъчната стена и клетъчната мембрана в *S. cerevisiae* и *E. coli*. Това е причината, поради която вътреклетъчните нива на РКВ се увеличават след екстрацелуларно прибавяне на H_2O_2 , като увеличаването зависи от концентрацията на прибавения към клетъчната суспензия H_2O_2 . Ние изследвахме нивото на *Ty1* транспозицията в *rho⁻* клетки, третирани с H_2O_2 с концентрации от 0,5 до 4 mM. Получените резултати (Фигура 30) показват, че при третиране на клетки 551 *rho⁻* за 30 минути с нарастващи концентрации на H_2O_2 честотата на *Ty1* транспозицията се повишава 5, 12 и 21 пъти респективно в сравнение с нетретираната контрола. Продължителността на третиране е 30 минути, защото е доказано, че концентрации на H_2O_2 до 25 mM за това време не увреждат ДНК. По този начин активираната от H_2O_2 *Ty1* транспозиция е резултат от повишеното количество на H_2O_2 , а не от повреди в ДНК.

Тези резултати показват, че прибавеният H_2O_2 в култура от *rho⁻* клетки набавя дефицита от РКВ и индуцира *Ty1* транспозиция при условия, при които няма данни за индуциране на повреди в ДНК. Чрез ДНК-ДНК хибридизационен анализ (Southern blot), проведен в нашата лаборатория е доказано, че водородният пероксид индуцира истинска *Ty1* транспозиция *de novo* и транспозицията не е резултат от генна конверсия.

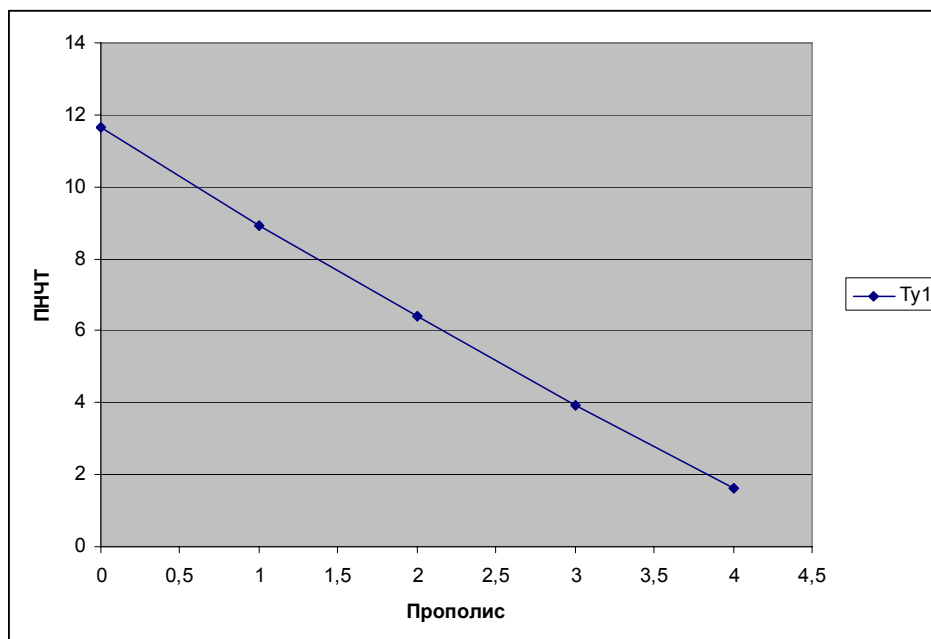
От представените резултати става ясно, че *rho⁻* мутантите нямат РКВ, но те могат да ги набавят чрез прибавяне на H_2O_2 в суспензията. Прибавеният H_2O_2 влиза свободно в клетките и активира *Ty1* транспозицията. Следователно, тези условия имитират условията, използвани при другите клетъчни тестове за

антиоксидантна активност, при които нивото на РКВ се повишава в тестерните клетки чрез прибавяне на H_2O_2 като реактив. Ние използвахме rho^- мутанти от тестерния щам, за да изследваме механизма, по който взаимодействат антиоксидант и прибавен като химикал H_2O_2 в Ту1антиРКВ теста.

4.7.1. Ту1антиРКВ тест с H_2O_2 и *S. cerevisiae rho⁻*

В тези експерименти прибавяхме 0,5mM H_2O_2 , вместо генериране на РКВ с канцероген и същите концентрации на прополис, като антиоксидант, както при rho^+ клетки. Резултатите са представени на Фигура 10.

От резултатите се вижда, че 4 и 3 мкг/мл прополис намаляват честотата на транспозиция 7 и 3,4 пъти съответно. Концентрации 2 и 1 мкг/мл са по-малко ефективни и намалението на Ту1 транспозицията е 2 пъти.



Фигура 10. Индукция на Ту1 транспозиция след третиране с прополис и H_2O_2

Както се вижда от фигура 10 антиоксидантна активност към концентрация се изразява в права пропорционална линия (скалата на ордината е метрична), който резултат е коренно различен от този, получен за Ту1антиРКВ теста, проведен с щам *S. cerevisiae 551 rho⁺*, където (клетките продуцират РКВ след третиране с канцероген). Инхибиране на транспозицията до 50% спрямо контрола 2 в *S. cerevisiae 551 rho-* т.е. намаляването ѝ от 11,67 до 5,83 се постига от около 2,51 µg/ml прополис (Фигура 10). Тази стойност е 3 пъти по висока от IC₅₀=0,7 мкг/мл прополис, получена при използване на CrVI или MMS като индуктори на РКВ в Ту1антиРКВ тест, проведен с опитен щам *S. cerevisiae rho⁺*.

От получените резултати могат да се направят два извода:

1) Промяната на РКВ от такива, продуцирани в тестерните клетки в РКВ, прибавени като реактив към теста е съпроводено с промяна на механизма, по който антиоксидантите неутрализират РКВ. Механизмът на взаимодействие между РКВ и антиоксидант рефлектира в зависимостта на антиоксидантната активност спрямо концентрацията на антиоксиданта. Тази зависимост при продуцираните в тестерните клетки РКВ е експоненциална, а при прибавените като реактив РКВ е пропорционална.

2) Експоненциалната зависимост между активност и концентрация на антиоксиданта означава по-висока ефективност на антиоксиданта при неутрализирането на РКВ в сравнение с пропорционалната зависимост. Следователно, активността на един антиоксидант е по - висока към РКВ, синтезирани в тестерните клетки и по – ниска към РКВ, прибавени като реактив в теста, какъвто е случая с опитите при използване на *rho⁻* клетки като тестер в Ту1антиРКВ теста.

IV.6. Увеличените нива на всички РКВ, а не само на O₂⁻, участват в канцероген-индуцираната Ту1 транспозиция.

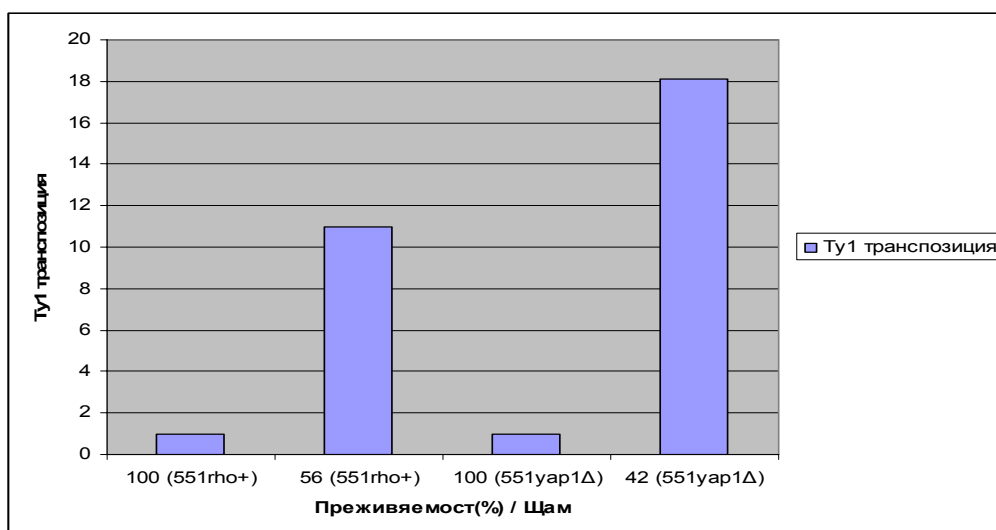
Подобно на другите еукариотни клетки дрождите *S. cerevisiae*, разполагат с механизми за защита от високи нива на РКВ. Супероксидният анион активира защитна система, чийто главен представител е супероксид дисмутазата (СОД). В *S. cerevisiae* съществуват няколко СОД със сходни и допълващи се

функции, които имат различна клетъчна локализация. Увеличените клетъчни нива на водороден пероксид (H_2O_2) индуцират експресията на група гени за синтез на ензими, които обезвреждат H_2O_2 и които не са свързани регулаторно със супероксид дисмутазната система. Между тях най-важна е каталазата, която превръща H_2O_2 във вода. Увеличената синтеза на тези ензими се активира от няколко транскрипционни фактора (*Yap1/2*, *Skn7*, *Msn2/4*), между които най-важен е *Yap1*. Така, че неутрализирането на O_2^- и на H_2O_2 става по два различни начина. До тук в изложението на нашите опити бяха описани резултати, доказващи ролята на O_2^- в канцероген-индуцираната Tu1 транспозиция. Те не доказват ролята на всички РКВ (например H_2O_2), в този процес поради различните механизми за неутрализация на отделните РКВ. Затова е необходимо да се изследва ролята и на другите РКВ в канцероген-индуцираната Tu1 транспозиция.

IV.6.1. Разрушаването на *Yap1* гена увеличава канцероген-индуцираната Tu1 транспозиция

При мутация или разрушаване на гена *YAP1* се блокира синтезата на *Yap1* белтъка, при което таргетите на *Yap1* гена не се активират и системата за неутрализиране на пероксиди се изключва от функция. В резултат на това се повишават вътреклетъчните концентрации на H_2O_2 , което позволява да се изследва ролята на H_2O_2 в канцероген-индуцираната Tu1 транспозиция. В тестерния щам 551 беше разрушен гена *YAP1* и беше изследвана честотата на Tu1 транспозицията в получените *yap1Δ* клетки (Таблица 2). В щам с нормално функциониращ *YAP1* ген (551 *YAP1* – първите два реда от таблицата), честотата на Tu1 транспозицията е увеличена 10-кратно след третиране с MMS. Третият ред от таблицата дава спонтанната подвижност на Tu1 в клетки *yap1Δ*, нетретирани с MMS. С тази стойност се сравнява индуцираната от MMS Tu1 транспозиция в клетки *yap1Δ* (четвъртия ред). Прави впечатление високото ниво на спонтанната Tu1 транспозиция - 38 транспозанта в *yap1Δ* клетки срещу 12 транспозанта в клетки с функционален *YAP1* ген. Високият фон на спонтанна транспозиция се дължи на високото ниво на H_2O_2 в

клетките *yap1Δ*, поради неработеща система за неутрализация на H_2O_2 . Третирането с MMS на такива клетки е съпроводено с голямо увеличаване на *Tu1* транспозицията (ПНЧ=18,1, таблица 2 последен ред, Фигура 11), поради натрупването на H_2O_2 и други РКВ в клетките. Важното в този случай е, че акумулираните в *yap1Δ* клетки РКВ са генерирани от клетките, а не прибавени като реактив.



Фигура 11. Ефект от разрушаването на *YAP1* гена върху *Tu1* транспозицията при третиране с 3,5 mM MMS

Резултатите, получени чрез разрушаване на *YAP1* гена, показват, че повишените вътреклетъчни концентрации на H_2O_2 при неактивна *Yap1* защитна система водят да повишаване подвижността на *Tu1* транспозона при третиране с канцероген, която е по-висока от това при функциониращ *YAP1* ген, поради високото ниво на продуцирани в клетките РКВ..

Таблица 18. Ефект на разрушаването на *YAP1* гена върху Ту1 транспозицията в клетки от щам 551.

Щам	MMS (3.5mM)	Преживяемост (%)	Брой транспозанти от 10 ⁸ клетки ¹⁾	ПНЧТ
551 <i>YAP1</i>	-	100	12±3,5	1.0
	+	56±0,29	136±13	11.0
551 <i>yap1Δ</i>	-	100	38±4	1.0
	+	42±0,28	694±27,5	18.1

551 *YAP1*- клетки с нормални митохондрии (*rho*⁺) и функциониращ ген *YAP1*

551 *yap1Δ* - щам с разрушен ген *YAP1* и нормални митохондрии (*rho*⁺)

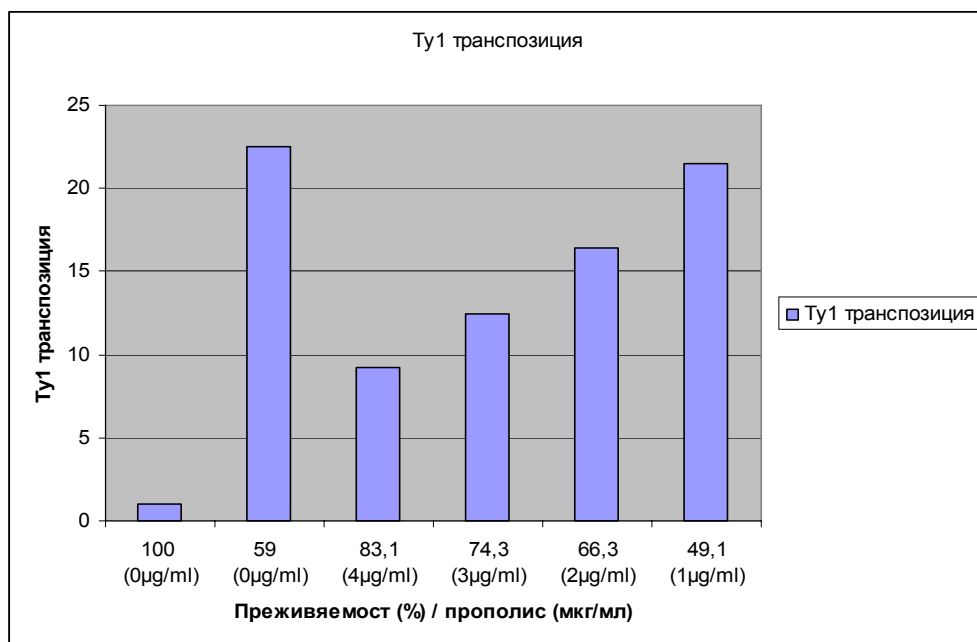
1)Средни стойности от ± S.D. 6 експеримента

IV.6.2. Ту1антиРКВ тест с щам *S. cerevisiae yap1 Δ*

В опитите с клетки *S. cerevisiae rho*⁻, използвани като тестерен щам в Ту1антиРКВ теста, бе установено, че прибавените като реактив РКВ в него (под формата на H₂O₂) се неутрализират от антиоксиданта по-слабо, отколкото същите антиоксиданти неутрализират РКВ, продуцирани в клетката (например след третиране с канцероген). Тази разлика в ефективността на антиоксидантите се изразява в различна зависимост между активност и концентрация – зависимостта е експоненциална при РКВ, индуцирани в тестерните клетки и е пропорционална при РКВ, прибавени като H₂O₂. В опитите с прибавен H₂O₂ е много трудно или невъзможно да се измери точно количеството на РКВ, тъй като то е в голям излишък и над капацитета за точност на количествените тестове за РКВ. Поради това възможно е РКВ в тези случаи да са в излишък и се поставя въпроса дали намерената разлика между зависимостта активност към количество на антиоксиданта не се дължи на акумулираните в тестерните клетки големи количества от прибавени РКВ. Тази възможност беше проверена (и се оказа, че не е вярна) в опити, в които се създават условия, при които тестерните клетки натрупват големи количества, **продуцирани** от тях РКВ. Това са клетките от щам *S.*

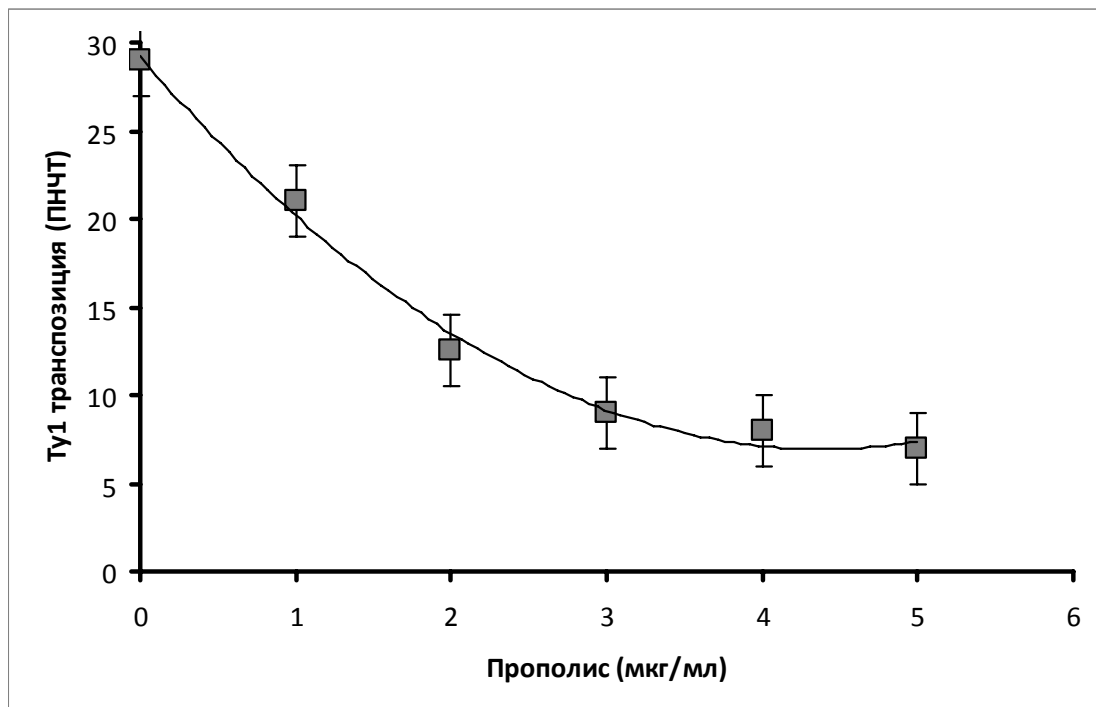
cerevisiae с разрушен *YAP1* ген, използвани в опитите с Ту1 антРКВ теста. Опитът беше проведен точно по протокола на теста, с канцероген MMS в концентрация 3,5 mM. Както вече беше споменато клетките с разрушен *YAP1* ген (*yap1 Δ*) натрупват големи количества ендогенни РКВ (поради неефективна защитна система) и третирането им с по-високи концентрации MMS (или друг генератор на РКВ) води до много ниска честота на преживяемост вследствие на оксидативен стрес. Резултатите от тези опите са представени на фигура 12.

Резултатите от Фигура 12 показват, че 4 мкг/мл прополис намаляват 2,4 пъти честотата на Ту1 транспозицията при 83% преживели клетки, а концентрации от 3 и 2 мкг/мл намаляват транспозицията по-малко от 2 пъти, но повишават преживяемостта до 74 и 66% съответно. Нивото на Ту1 транспозиция и преживяемостта, получени след използване на 1 мкг/мл прополис е сравнима със стойностите, получени с канцерогена (MMS).



Фигура 12. Зависимост на Ту1 транспозиция и концентрацията на прополис в *S. cerevisiae yap1 Δ*

Стойностите на прополиса, водещи до 50% намаляване на Tu1 транспозицията в този експеримент са различни от стойностите, намаляващи до 50% транспозицията, индуцирана от Cr VI и MMS. Причината за това е, че в опитите с *yap1*Δ тестер повишаването на Tu1 транспозицията в Контрола 2 е по-високо от 10 и ако се приложи формулата за Ту1антиРКВ тест, то стойностите за IC₅₀ се изравняват.



Фигура 13. Експоненциална зависимост на активност (ПНЧТ) и концентрацията на прополис в *S. cerevisiae yap1* Δ. Ако скалата на ординатата се промени в логаритмична, зависимостта активност към концентрация се изразява в права линия.

Фигура 13 сумира резултатите от Ту1антиРКВ теста на прополис, проведен (шесткратно) щам *S. cerevisiae yap1*Δ и MMS в крайна концентрация 3,5 mM. Получените данни показват ясно експоненциална зависимост между антиоксидантната активност (мерена като ПНЧТ) и концентрацията на прополис. Въпреки, че в

тестерните клетки са акумулирани РКВ, водещи до високи стойности на $Ty1$ транспозиция (ПНЧТ>25), зависимостта активност към концентрация на антиоксиданта е експоненциална, което доказва високата ефективност на антиоксидантите в прополиса. Следователно високите нива на РКВ не са причината, определяща пропорционалност между активност и концентрация на антиоксидантите в опитите с *rho*-клетки - главният фактор е произхода на РКВ. Ако РКВ са продуцирани в клетката, даже и в излишък, антиоксидантът ги неутрализира по-ефективно, което се изразява в експоненциална зависимост между неговата активност и концентрация.

5. ДИСКУСИЯ

5.1. Пропорционална зависимост между увеличените нива на РКВ и честотата на Tu1 транспозицията

Получените резултати доказват зависимост на канцероген-индуцираната Tu1 ретротранспозиция от нивото на РКВ. Мобилността на Tu1 ретротранспозона и нивата на O₂ са изучени след третиране с различни генотоксини, включващи лабораторни канцерогени, жлъчни киселини и метали. Генотоксините, класифицирани като човешки канцерогени, EMS, B(a)P, B(a)A, свободните жлъчни киселини- CDH, LH и тежките метали- As, CrVI и Pb, генерират супероксидни аниони и активират Tu1 ретротранспозицията. Генотоксините, класифицирани като мутагени без канцерогенен потенциал, B(e)P, B(b)A, жлъчните киселини-TDH, GDH и метала Zn (цинк) не продуцират РКВ и не индуцират Tu1 транспозиция. Литературните данни за CrIII, използван в нашата работа, са противоречиви. Опитите *in vitro* показват, че CrIII има потенциал да реагира с ДНК, предизвиквайки повреди, а *in vivo* изследвания доказват, че CrIII няма генотоксичен ефект в човешки и животински клетки и комплексите от тривалентен хром се използват широко от десетилетия като усилватели на инсулина, при пациенти с диабет тип 2. Въпреки данните, че CrIII не е канцерогенен, в литературата има предположения за възможната му канцерогенност (Dillon et al., 2000; Lenna and Lay 2008) и интересът към него е голям. Допуска се, че веднъж навлязъл в клетката, CrIII може да се окисли до CrVI, за който е доказано, че е човешки канцероген. Изследван е ефекта на CrIII в дрожди *Saccharomyces cerevisiae* (Jianlong et al., 2003) и представените резултати показват само умерено инхибиране на клетъчния разтеж, без да се наруши синтеза на белтъци и нуклеинови киселини. За разлика от CrVI, който индуцира окислителен стрес, тривалентния хром няма ефект върху нивото на РКВ при остеобласти (Fu et al., 2008) и индуцира незначително нива на РКВ в Hep-2 клетки едва след няколко месечно третиране (Rudolf and Cruvenka, 2003).

Нашите резултати показват, че CrVI индуцира високи нива на РКВ и активира Tu1 ретротранспозицията, за разлика от CrIII,

който не предизвиква оксидативен стрес и не повишава честотата на Tu1 ретротранспозицията, което е намерено и за други неканцерогенни генотоксини. Тези резултати доказват, че избраната моделна система за отчитане на антиоксидантна активност се отличава с голяма чувствителност. Активирането на Tu1 транспозицията - процесът, лежащ в основата на Ту1антиРКВ теста, е толкова чувствителен, че прави разлика между валентността на един елемент-активира се от CrVI и не се активира от CrIII. Чувствителността на използвания в Ту1антиРКВ тест клетъчен процес-Tu1 транспозицията, допринася за чувствителността и на измерване на антиоксидантни свойства с него. Пример за тази голяма чувствителност е положителния резултат на Ту1антиРКВ теста при изследване на пчелното млечице (виж Глава 5.2). При използване на други клетъчни тестове антиоксидантна активност на пчелното млечице не е открита (Nakajima et al.,2009), въпреки че такава е доказана с *in vitro* тестове.

Индукцията на оксидативен стрес от канцерогени и липсата на високи нива на РКВ при третиране с неканцерогенни мутагени на клетки *S.cerevisiae*, доказани в дисертацията, съответства на публикувани до момента резултати за други клетки. Установени са високи нива на РКВ след третиране на хепатоцити с EMS (Tirmenstein et al., 2000; Zhang et al.,2001), на Т-лимфоцити с формалдехид (Satio et al., 2001) или на мишки (Jung et al., 2007), с B(a)P и B(a)A (Toyooka and Ibuki.,2007), с канцерогенни жлъчни киделини DHL и LH (Bernstein et al., 2005), с As (Rodrigues-Gabrial and Russel, 2005), CrVI (Fu et al., 2008) и Pb (Hsu et al., 1997, 1998). След третиране с мутагени, без канцерогенно действие като B(e)P, B(b)P, anthracene (Toyooka and Ibuki, 2007; Zbigniev and Wojceich, 2006) и Zn (Sankavarum et al., 2009) са установени ниски нива на РКВ.

Високите нива на РКВ не могат да бъдат обезвредени ефективно, което води до негативни ефекти, като деестерификация на фосфолипиди, акумулиране на мастни киселини в мембранните бислоеве или смущение във функцията на протеини (Herro et al., 2008). РКВ генерират също различни ДНК-повреди, включващи

модифициране на бази и захари, абазични места, ДНК-протеинови cross-links, едноверижни скъсвания, загуба на хромозоми (Lawrence and Henkle 1996; Bohr 2002). В литературата има много данни (Salomon et al., 2004; Tucker and Fields 2004; Lessage and Todeschini 2005; Nyswaner et al., 2008), показващи ролята на ДНК-повредите, индуцирани от физични и химични агенти и значението им за мобилността на Ty1 ретротранспозона. Освен директните ДНК повреди, третирането с канцерогенни генотоксини предизвиква и вторични ДНК повреди, дължащи се на породения от генотоксините оксидативен стрес. Нашите резултати отчасти са в съответствие с това твърдение и едно от възможното обяснение е, че под действието на канцерогени се повишават нивата на РКВ, получават се директни ДНК повреди, които участват в активиране на Ty1 ретротранспозицията.

Обаче, когато клетките се третират предварително с N-ацетилцистеин, който погасява високите нива на РКВ, следващото им третиране с канцерогени не индуцира Ty1 ретротранспозиция. Следователно увеличаване нивата на РКВ е първото събитие, което има ключова роля в инициацията на активирането на Ty1 мобилността. Ефектът на директното ДНК увреждане в последствие вероятно се мултиплицира чрез появата на вторични ДНК повреди, дължащи се на вече възникналия оксидативен стрес. Ролята на високите нива на РКВ за индукцията на Ty1 мобилността е установена и от други автори (Paquin and Williamson 1984, 1986), които доказват, че култивирането при субоптимални температури от 15-20°C (вместо 30°C) активира Ty1 ретротранспозицията увреждане на ДНК. Установено е, че при 15-20°C клетки *S.cerevisiae* произвеждат по-високи нива на РКВ в сравнение с нивата, произведени при 30°C (Zhang et al., 2003), което е причина за увеличаване на мобилността на Ty1 транспозона.

В предишни изследвания е установено, че нивото на РКВ се повишава след третиране с MMS и това увеличава подвижността на Ty1 ретротранспозона (Stoycheva et. al., 2010). Следователно РКВ играят ролята на активатор на Ty1 ретротранспозицията. Ние установихме, че щам *S.cerevisiae*, третиран с канцерогени (за които е известно, че са генератори на РКВ в животни и човек), активират

Ty1 транспозицията. Изследвахме ефекта на различни мутагени и открихме, че те повишават нивото на РКВ, които активират Ty1 ретротранспозицията само, когато мутагенът е канцероген. При използване на мутагени без канцерогенни свойства, нивата на РКВ и честотата на Ty1 транспозицията са ниски. Съществува зависимост между високите нива на РКВ и повишената мобилност на Ty1 ретротранспозона, като двукратното увеличаване на нивото РКВ води до двукратно увеличаване честотата на Ty1 транспозицията. Следователно има права пропорционалност между увеличените нива на РКВ и увеличената Ty1 транспозиция.

Новото в нашите изследвания се изразява в доказване на права пропорционалност между нивото на РКВ и нарастването честотата на Ty1 ретротранспозицията. Това даде възможност за създаване на принципно нов метод за определяне на антиоксидантна активност, наречен **Ty1антиРКВ тест**.

Тъй като мобилността на Ty1 ретротранспозона варира пропорционално на нивото на РКВ, генерирани в клетки *S.cerevisiae*, това позволява да се определи антиоксидантната активност чрез промяна в един клетъчен процес, вместо използване на химични реакции.

Реактивните кислородни видове, включващи супероксидния анион (O_2^-), водородния прекис (H_2O_2) и синглетния кислород (O_2) са неизбежно следствие от аеробния метаболизъм на клетките. Такива окислителни агенти се съдържат във вода, храна, въздух и тяхното натрупване в клетките може да доведе до окислителен стрес, свързан с хронични инфекции, кардио-вазкуларни заболявания, тумори, Алцхаймер, стареене.

Антиоксидантите са молекули, способни да предпазват окислението на биомолекулите. Клетките притежават защитни системи от антиоксиданти, включващи ензими, глутатион и витамини. Плодовете, зеленчуците и всички пчелни продукти съдържат разнообразни съединения с антиоксидантна активност и епидемиологични изследвания показват, че редовната им консумация намалява риска от развитие на тумори и кардио-вазкуларни заболявания.

Не всички редуктори, участващи в химични реакции са антиоксиданти. Само съединенията, които могат да навлязат в клетката и да предпазат биологичните мишени от РКВ са антиоксиданти. Механизмите за предпазване са няколко и включват: нхибиране генерирането на РКВ или увеличаване активността на антиоксидантните ензими. Механизмът на действие на антиоксидантите в живи клетки не се свежда само до гасене на свободните радикали или до активирането на антиоксидантни ензими, а до участието им в процеси като генната експресия, канцерогенезата, сигналната трансдукция, както и стимулирането на имунната система.

Големият интерес за ролята на свободните радикали в патогенезата на заболявания при човека и ползата от консумация на храни с антиоксидантни свойства доведе до необходимостта от създаване на методи за измерване на антиоксидантите *in vivo* и *in vitro*. Ако се изследва биологичният ефект на антиоксидантите, то тези методи трябва да отразяват основната им характеристика и комплексна природа. Първият основен проблем, който трябва да се в предвид е, че свободните радикали са високореактивни и кратко живущи. Веднъж произведени, те веднага атакуват най-близката мишена. Другият въпрос за разрешаване е биологичният ефект на антиоксиданта и неговият метаболизъм. Видът на антиоксидантите в храните не е необходимо да е същия, който неутрализира свободните радикали. В резултат от метаболизма оригиналният антиоксидант не винаги достига до целта. За това е необходимо да се измери активността на антиоксидантите, чрез методи, отчитащи тяхната способност да навлизат в клетките в активна форма, за да неутрализират свободните радикали непосредствено след тяхното образуване. Никой от сега съществуващите тестове не отговаря на тези критерии и необходимостта от създаването на нови тестове е очевидна..

5.2. Tu1антиРКВ тест за определяне антиоксидантна активност: предимства и недостатъци

Основното предимство на Tu1антиРКВ теста е, че с него се определя антиоксидантна активност чрез изследване на един

клетъчен процес-Ty1 транспозицията. Всички други тестове (*in vitro* и клетъчни) определят антиоксидантната активност посредством химични реакции. Макар химичните реакции да са лесни и бързи за изпълнение, те не измерват биологичния ефект на антиоксидантите и не отразяват състоянието *in vivo*. Обратно, Ty1антиРКВ тестът е много близо до ефекта, който антиоксидантите имат *in vivo*.

Тестът Ty1антиРКВ определя антиоксидантната активност само в живи клетки: в опитните клетки се продуцират РКВ, част от които взаимодействат с антиоксиданта, а останалите РКВ активират Ty1 транспозицията. В резултат на това се появяват HIS⁺ колонии, а техният брой се отнася към броя живи клетки, определени като „Преживяемост” във всеки опит. Фактът, че Ty1антиРКВ теста се отчита **само в живи** клетки, означава че той измерва ефекта на антиоксиданти спрямо **физиологично активни в живите клетки РКВ**. Една от функциите на физиологичните РКВ е да активират Ty1 транспозицията в *S.cerevisiae*. Другите известни до сега тестове измерват ефекта на антиоксиданта спрямо всички РКВ в клетката, без да правят разлика между функционално активни или неактивни РКВ. Липсват и данни за определяне на преживяемостта на опитните клетки при другите тестове, от което следва, че те определят антиоксидантната активност в живи и неживи клетки (напр. лизати, екстракти).

Тестът Ty1антиРКВ измерва количествено антиоксидантната активност чрез количествено определяне честотата на Ty1 транспозицията. Стойността за антиоксидантната активност (IC₅₀) може да се сравни с IC₅₀ стойностите, получени в теста с различни антиоксиданти. Освен това IC₅₀ е сравнима със стойности, получени в други тестове за определяне на антиоксидантна активност, ако резултатите получени в тях се отнесат към избран стандарт, какъвто например е NAC. Повечето, ако не и всички други тестове определят антиоксидантната активност в единици, специфични само за използвания тест и резултатите не могат да се сравняват с резултати, получени в друг тест за същия изследван продукт.

Всички тези характеристики правят Tu1антиРКВ теста единствен за сега, определящ количествено **биологичния** ефект на антиоксидантите и тест, който е най-близък до условията *in vivo*

Разработеният от нас тест е признат като „Полезен Модел” и той е универсален, защото може да се използва за количествено определяне на антиоксидантна активност и получените резултати могат да се сравняват с резултатите от други тестове. Тестът се характеризира с това, че измерването на антиоксидантната активност става чрез инхибиране честотата на транспозиция на Tu1 транспозон, без използване на химични реакции..

Предложеното средство за количествено определяне на антиоксидантна активност може да се използва за изследване на различни вещества, продукти, медикаменти, телесни течности или компоненти от тях. Екстракти от изследваните вещества във вода, етанол или диметилсулфоксид могат да се изследват директно в предложения тест, докато такива, получени с органични разтворители предварително се изпаряват под вакуум, до сухо вещество, след което се разтварят във вода, етанол или диметилсулфоксид.

Като проблеми (неостатъци) на теста могат да се споменат следните:

- 1) Необходима е периодична проверка на тестерния щам *S.cerevisiae* 551 при продължителната му употреба, за избягване на неговото замърсяване.
- 2) Поддържане на постоянна температура от 20°C, при която се измерва ПНЧТ; поддържане на такава температура през летните месеци е проблем без функционираща хладилна стая.
- 3) Както при повечето тестове, така и при този се получават вариации в резултатите от около $\pm 10\%$, което се счита за допустимо при тестове, базирани на живи клетки .
- 4) Тестът е бавен и резултати се получават след 6 дни
- 5) Тестът не е автоматизиран
- 6) В някои лаборатории употребата на канцерогени не е желателна.

5.3. Механизъм на Tu1антиРКВ теста

До сега с Tu1антиРКВ теста бе изследвана антиоксидантната активност на прополис, пчелно млечице и пчелен мед (произведени в България) и предложения механизъм на теста е базиран на резултатите от тези изследвания..

Инхибирането на Tu1 транспозиционната честота, което е показател за активността, с нарастването на концентрацията на изследваните продукти показва експоненциална зависимост. Тя може да се превърне в линейна пропорционална зависимост чрез преминаване в полулогаритмична координатна система, за да се изрази по ясно инхибирането на Tu1 транспозицията с 50% (IC₅₀). Изчислените IC₅₀ стойности подреждат антиоксидантната активност на трите продукта в следния ред: прополис>пчелно млечице>пчелен мед. Приблизително еднакви стойности на IC₅₀ се получават при експерименти с MMS (като индуктор на РКВ), както с CrVI. Това показва, че използването на различни канцерогени като индуктори на РКВ не повлияват точността на Tu1антиРКВ теста.

Пчелните продукти се характеризират със сложен състав-високото съдържание на захари, витамини, протеини и други биоактивни молекули. Поради високата метаболитна активност на тези продукти, направихме контролен експеримент при аналогични условия, като за гасител на РКВ вместо прополис използвахме N-ацетилцистеин. Отново беше отчетена експоненциална зависимост между активност и концентрация на антиоксиданта. Следователно, експоненциалното намаляване на Tu1 транспозицията се дължи на антиоксидантната активност на пчелните продукти. Поради това бе изследван клетъчния механизъм на Tu1антиРКВ теста, като вероятна причина за експоненциалната зависимост между активност и концентрация на антиоксиданта.

Основната разлика между Tu1антиРКВ теста и всички други известни тестове е начина, по който се повишават нивата на РКВ в опитните клетки. В нашия тест РКВ се повишават ендогенно, докато в другите тестове нивата на РКВ се повишат екзогенно чрез прибавяне на H₂O₂ към клетъчните супензии. Ние допуснахме, че

антиоксидантите имат различна активност спрямо клетъчно-продуцираните РКВ и тези, добавени чрез H_2O_2 .

Тестът беше проведен с дрожди *S. cerevisiae rho⁻* като нивото на РКВ беше повишено чрез добавяне на $0,5mM H_2O_2$, вместо чрез третиране с канцероген. В резултат на това се наблюдава пропорционално намаляване на Tu1 транспозицията с повишаване концентрацията на пчелният продукт и липсва експоненциална зависимост, установена при ендогенно продуцирани РКВ. Това означава, че антиоксидантната активност е пропорционална на концентрацията на антиоксиданта, само когато РКВ се прибавят екзогенно като H_2O_2 . При смяна на произхода на РКВ от синтезирани в тестерните клетки с РКВ, прибавени като H_2O_2 се наблюдава промяна във взаимодействието им с антиоксиданта, т.е. активността на антиоксидантите зависи от произхода на РКВ.

Отговорът на Tu1антиРКВ теста зависи не от количеството (или излишъка) на РКВ, а от техния произход. Когато РКВ са продуцирани вътре в клетката (ендогенно), антиоксидантите са по-ефективни при неутрализирането им, което се изразява чрез експоненциална зависимост на антиоксидантната активност от концентрацията. Ефективността на антиоксидантите към РКВ е по-слаба, ако те са акумулирани в опитните клетки с екзогенен H_2O_2 .

Линейна или нелинейна, но не експоненциална зависимост е получена с другите клетъчни тестове при изследването на антиоксидантната активност на природни продукти, включително и пчелни. Пропорционална зависимост се получава и при Tu1антиРКВ теста, при третиране на тестерни *rho⁻* клетки с екзогенни източници на РКВ, добавени под формата на H_2O_2 . Тези условия са много сходни с условията при други тестове, където се добавя H_2O_2 за постигане на високи вътреклетъчни нива на РКВ, необходими за определянето на антиоксидантната активност на различни храни или хранителни добавки. Концентрациите на H_2O_2 за достигане на необходимото ниво на РКВ в различните тестове са високи ($1-167mM H_2O_2$) и токсични за клетките. Такива концентрации на водородния пероксид инактивират каталазата чрез превръщането на активния каталаза- H_2O_2 комплекс I в

инактивен катализа- H_2O_2 комплекс II, водещо до неефективно разпадане на H_2O_2 (Bonnichen et al., 1947; Aebi et al., 1987). Някои от кислородните радикали като O_2^- не могат да преминат през клетъчната мембрана, остават вътре в клетката и така в тях се акумулират РКВ. Високите нива на вътреклетъчни РКВ в тези случаи се дължат на извънклетъчно добавен H_2O_2 , а не на РКВ, генерирани в клетките. В резултат на това IC_{50} стойностите, получени чрез Ту1антиРКВ теста в тестерните rho^- клетки, са около 4 пъти по-високи в сравнение с клетките rho^+ , което води до погрешно определена стойността за антиоксидантна активност.

Грешката при определяне на антиоксидантна активност ще е по-голяма в тестове, използващи клетъчни култури. Открито е, че антиоксидантите и то главно полифенолните съединения, взаимодействат с компонентите на хранителната среда за клетъчни култури, при което се получава водороден пероксид, което води до грешки (Long et al., 2000). Пчелните продукти съдържат полифенолни съединения като основни антиоксиданти и поради това ние проверихме дали прополисът, пчелното млечице и пчелният мед проявяват прооксидантни свойства в хранителните среди за култивиране на клетки *S.cerevisiae*. Третирахме културите с три пъти по-високи концентрации на пчелните продукти от използваните в Ту1антиРКВ теста и такъв ефект не беше установен.

В *in vitro* експерименти, използващи циклична волтметрия за изследване взаимодействието между оксидант/антиоксидант е определена различна ативност на антиоксидантите към кислородните радикали. Бързото и често взаимодействие на кратко живущите свободни радикали с антиоксиданти се променя в бавно и рядко взаимодействие (Ahmed et al., 2012), при използване на по-стабилни свободни радикали. Въпреки, че резултатите от *in vitro* тестовете не винаги отговарят на *in vivo* условията, трябва да се подчертае че клетъчно-генерираните РКВ са много нестабилни и кратко живущи, докато H_2O_2 е относително стабилен химикал.

Всички тези данни съвпадат с получените в дисертацията резултати, което позволява предполагагането на следния клетъчен маханизъм на Ту1антиРКВ теста. Генерираните в клетките РКВ са

биологично активни и индуцират Tu1 транспозицията пропорционално на тяхната концентрация. Прибавените пчелни продукти (антиоксиданти) неутрализират част от РКВ и понижават честотата на Tu1 транспозицията. Високата ефективност на антиоксидантите към физиологично активните РКВ се изразява в експоненциална зависимост на антиоксидантната активност спрямо концентрацията. При екзогенно добавяне на H₂O₂ в теста (*rho*⁻ клетки без функционално активни митохондрии) нивото на РКВ се повишава. Такива РКВ са относително стабилни и функционално не активни и повишават по-слабо честотата на Tu1 транспозицията, в сравнение с ендогенно синтезираните РКВ. Неутрализирането на екзогенно повишените нива на РКВ изисква по-големи количества от антиоксиданта, защото тяхното взаимодействие с оксидантите е по-забавено, не толкова често и, следователно, по-малко ефективно. По този начин зависимостта на антиоксидантната активност от концентрацията се променя от експоненциална в пропорционална и изчислените стойности на IC₅₀ са по-високи. Този модел на клетъчен механизъм, по който се определя антиоксидантната активност с Tu1антиРКВ теста е съобразен с резултатите, получени досега и отразени в дисертацията. Възможна е промяна в обяснение на механизма на Tu1антиРКВ теста с получаване на нови резултати при използване на теста за определяне антиоксидантна активност на други храни или продукти.

5.4. Приложимост на Tu1антиРКВ теста

До сега Tu1антиРКВ теста е използван за определяне антиоксидантна активност на пчелни продукти, произведени в България. Предстои използването му за изследване на други храни и продукти, също с български произход. От досегашната ни практика смятаме, че единственият проблем, който може да възникне при разширяване периметъра на изследвани продукти е получаването на екстракти или лизати от тях. Когато се налага използването на разтворител, различен от вода, могат да се използват диметилсулфоксид или етанол, както бе описано в глава „Резултати”. При използването на органични разтворители, които

са токсични за дрожди, трябва предварително пробите да се изпарят във вакуум и утайката да се разтвори във вода, диметилсулфоксид или етанол.

Относно възможното използване на Tu1антиРКВ теста, би трябвало да се има предвид, че резултати от него се получават за 6 дни и следователно той не може да се конкурира с някои други *in vitro* тестове (част от тях автоматизирани и с фабрично получени китове), които дават резултат за минути. Проблемът е, че тези резултати НЕ отразяват биологичната активност на изследваните антиоксиданти и в повечето случаи са заблуждаващи. Затова, ако цел на изследването е да се установи ефекта, който един антиоксидант-съдържащ продукт би имал *in vivo*, то изборът трябва да бъде антиоксидантен тест, в който антиоксидантната активност се измерва спрямо РКВ, продуцирани в тестерните клетки.

VI. ИЗВОДИ

1. Доказана е право-пропорционална зависимост между активиране на подвижността на Ty1 транспозон в дрожди *S.cerevisiae* и нивото на РКВ синтезирани в клетките.

2. Създаден е принципно нов тест за определяне на биологичната активност на антиоксиданти, наречен Ty1антиРКВ тест. Нашият принос се състои в това, че Ty1антиРКВ теста определя количествено антиоксидантна активност не с химични реакции както е при всички други публикувани до сега антиоксидантни тестове, а чрез промени в един клетъчен процес - Ty1 транспозиция.

3. Тестът Ty1антиРКВ е използван за определяне на антиоксидантна активност на прополис, пчелно млечице и пчелен мед, произведени в България и е установено, че антиоксидантната активност на прополис е най-висока, следвана от тази на пчелното млечице и пчелния мед.

4. В Ty1антиРКВ теста зависимостта между активността на антиоксиданта и неговата концентрация е експоненциална, а не пропорционална, както е при другите публикувани досега тестове.

5. Експоненциалната зависимост между активност и концентрация в Ty1антиРКВ теста се променя в пропорционална зависимост при използване на тестерен щам без РКВ (*rho*- мутант) и прибавяне на РКВ под формата на водороден пероксид.

6. Доказано е, че биологичната активност на един антиоксидант се определя от произхода на РКВ- активността е по-висока към РКВ, синтезирани в опитните клетки и по-ниска спрямо РКВ, прибавени като реактив.

VII. ПРИНОСИ

1. Установена е право-пропорционална зависимост между активиране подвижността на Ty1 транспозон в дрожди *S.cerevisiae* и нивото на РКВ синтезирани в клетките.

2. Създаден е принципно нов тест за определяне на биологичната активност на антиоксиданти, наречен Ty1антиРКВ тест.

3. Адаптиран е към дрожди *S.cerevisiae* Ty1антиРКВ тест. Тестът позволява определяне антиоксидантна активност на продукти с различен произход.

4. Доказано е, че а) канцерогените повишават нивото на РКВ, което е първата причина за индукция на Ty1 транспозицията в дрожди *S.cerevisiae* и б) биологичната активност на един антиоксидант зависи от това дали РКВ са синтезирани в тестерните клетки или са прибавени като реактив.

VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

9.1. В международни списания с импакт фактор

1. **Martin Dimitrov**, Pencho Venkov, Margarita Pesheva, 2011, The positive response of Ty1 retrotransposition test to carcinogens is due to increased levels of reactive oxygen species generated by the genotoxins, Arch Toxicol, 85: 67-74.

IF=4, 049

9.2. В български списания

1. M. Georgieva, **M. Dimitrov**, O. Krastanova, V. Bankova, M. Pesheva, 2011, Antioxidant effects propolis and CAPE on ty1 transposition in Yeast Saccharomyces cerevisiae, Младежка научна конференция „Климентови дни”, Сборник статии, Книжка втора, ISSN: 1314-4960, 27-29.

9.3. В книги

1. T. Stoycheva, M. Pesheva, **M. Dimitrov** and P. Venkov, 2012, The Ty1 retrotransposition Short-Term Test for Selective detection Carcinogenic genotoxins, published in the book: Carcinogen, ISSN: 978-953-51-0658-6, Publisher InTech (Croatia),

9.4. Патенти

1. Пенчо Венков, М. Пешева, Т. Стойчева, А. Атанасов, **М. Димитров**, 2011, Средство за количествено определяне на антиоксидантна активност в живи клетки, „Патентно ведомство на България”, №14 60/ 10. 08. 2011 г.

9.5. Участия в научни форуми

9.5.1. С доклади

1. **Martin Dimitrov**, Maya Georgieva, Vassya Bankova, Margarita Pesheva, 2011, Analysis of Antioxidant properties of Bulgarian bee products, Семинар по Екология, секция ‘ Биология’ ИБЕИ – БАН
2. **Dimitrov M.**, M. Pesheva, 2012, Determination of antioxidant activity of honeybee products (honey and royal jelly) from Bulgarian origin, by a new test, Proceedings of the third workshop on experimental models and methods in biomedical research, Bulgarian Academy of sciences, Sofia, Bulgaria, p. 40-41.

9.5.2. С постери

1. Selective Response to Carcinogens of a New Short-Term Test
Balkanika 2009; 6-th Balkan Congress of Microbiology; 4-th Congress of Macedonian Microbiologists
2. **Dimitrov M.**, M. Georgieva, M. Pesheva, 2010, Analysis of the Antioxydant Properties of Bulgarian Propolis, Младежка Научна Конференция „Климентови Дни”, СУ „Св. Климент Охридски, 22-23 ноември., с. 37.
3. M. Georgieva, **M. Dimitrov**, O. Krastanova, V. Bankova, M. Pesheva, 2011, Antioxidant effect of propolis and CAPE on Ty1 retrotransposition in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Младежка Научна Конференция „Климентови Дни”

Общ импакт фактор по темата на дисертацията: 4,049

Общ импакт фактор от всички публикации: 8, 271