

Софийски университет “Св. Климент Охридски”

Биологически факултет

Катедра Биохимия

Ваня Петрова Колева

**Проучване върху генотоксичното и цитотоксично
действие на структурния пентозен аналог *4-bromo-
N,N-diethyl-5,5-dimethyl-2,5-dihydro-1,2-oxaphosphol-2-
amine 2-oxide* върху митотични клетки**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация за присъждане на образователната и научна степен
„ДОКТОР”

професионално направление 4.3. Биологични науки
докторска програма Молекулярна биология

Научни консултанти:

проф. дбн Севдалин Георгиев

доц. д-р Мариела Оджакова

София, 2012 г.

Дисертацията е написана на 138 страници и включва 46 фигури и 17 таблици.
Списъкът на цитираната литература съдържа 308 литературни източника.

Изследванията, отразени в представеният дисертационен труд, са финансирани от:

- Фонд “Научни изследвания” по договор DO 02-86/13.12.2008;
- ШУ “Епископ Константин Преславски”;
- Istituto Oncologico Veneto, Padova, Italy.

Дисертационният труд е обсъден и одобрен за защита на разширен катедрен съвет на Катедра Биохимия на Биологически факултет на СУ “Св. Климент Охридски”, проведен на 13.11.2012 г.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АМ	анафазен мост
АСМ	атомно-силов микроскоп
АТФ	аденозинтрифосфат
ДВР-ДНК	двуверижни разкъсвания в ДНК
ДЯ	двуядрена клетка
ИХР	хромозома с изохроматидно разкъсване
КМ	К-митоза
МИ	митотичен индекс
МП	многополусна анафаза/телофаза
МЯ	клетка с микроядра
ОК	отрицателна контрола
ОФС	органофосфорни съединения
ПК	положителна контрола
РСМ	Разкъсване-Сливане-Мост
СМ	светлинен микроскоп
СХ	странстваща хромозома
Т/Т	теломерно слепване
ФИ	фазов индекс
ХЗР	хромозомно разкъсване
ХТР	хроматидно разкъсване
ХФ	хромозомен фрагмент
Ц/Ц	центромерно слепване
ЯМР	ядрено магнитен резонанс
АТМ	Ataxia-Telangiectasia Mutated
BrdU	5`-бром-2`-дезокси-уридин
Br-oxph	4-bromo-N,N-diethyl-5,5-dimethyl-2,5-dihydro-1,2-oxaphosphol-2-amine 2-oxide
Chk-2	Checkpoint proteins
EC50	ефективната концентрация, която намалява растежа на корена с 50 % спрямо контролата
IC50	средна Инхибираща Концентрация
ICR	Inbred Convention Line (инбредна конвенционална линия)
MMC	Methyl MethaneSulfonate (метил метансулфонат)
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development (Организация за икономическо развитие и сътрудничество)
WHO	World Health Organization (Световна здравна организация)

УВОД

Органофосфорните съединения (ОФС) намират широко приложение в индустриалното производство, селското стопанство, медицината и бита (Jiang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Bakare *et al.*, 2009; Lehner *et al.*, 2010; Tolstikova *et al.*, 2011). Много от агрохимикалите са разработени на базата на органофосфорни съединения. Те са активния компонент и в някои препарати използвани в медицината за лечение на редица тежки заболявания (Chu *et al.*, 1995; Koszalka *et al.*, 1996; Tam *et al.*, 2000; Kamiya, 2003; Pescovitz, 2008; Okano, 2009).

Към групата на ОФС се отнасят ДНК и РНК – две молекули с изключително значение за живите организми. Установено е, че аналозите на природни нуклеозиди и нуклеотиди с модифициран пентозен остатък проявяват антивирусно и антитуморно действие (Brel, 2008; Rad *et al.*, 2010). Хетероциклените оксафосфоли са група органични съединения с кислороден и фосфорен атом в пръстена. Към тази група принадлежи и изследваното от нас съединение *4-bromo-N,N-diethyl-5,5-dimethyl-2,5-dihydro-1,2-oxaphosphol-2-amine 2-oxide* (Br-oxph). Като хетероциклено съединение с кислороден атом в петчленен пръстен, Br-oxph се явява структурен аналог на фуранозите, към чиято група принадлежат пентозите рибоза и дезоксирибоза.

Оксафосфолите са съединения, които все още не са намерили приложение в практиката. Малкото изследвания относно биологичната им активност показват антимикробна (Haranath *et al.*, 2005), антивирусна (Каменова и съавт., 1996), генотоксична активност (Енчев и съавт., 2006) и способност да повлияват растежа на някои културни растения (Enchev *et al.*, 1986; Калчев и съавт., 2005). Тези данни, както и структурната аналогия между Br-oxph и активните съставки на някои лекарствени препарати, показват че вероятно това съединение може да оказва генотоксично и цитотоксично влияние върху митотичните клетки на различни еукариотни организми. Поради това е необходим комплексен подход в изследванията относно неговата биологичната активност – проучванията трябва да включват няколко метода и тест-обекта в *in vivo* и *in vitro* условия.

Кореновата система обикновено е първата част от растението, която се оказва в контакт със замърсителите на околната среда. Поради това в изследванията за токсичност на химични субстанции първата стъпка е оценка на степента на инхибиране на кореновия растеж на културни растения. Много често тест-обект в цитогенетичните изследвания е *Allium cepa* L., тъй като се отличава с висока чувствителност към въздействието на различни химични съединения (Levan, 1938; Grant, 1982; Fiskesjö, 1985; Rank, Nielsen, 1993; Smaka-Kincl *et al.*, 1996; Rank, 2003; Leme, Marin-Morales, 2009; Silva *et al.*, 2011). Анализът на активно делящите се меристемни клетки на корена позволява да се установят някои нарушения в процеса на нормалното клетъчно делене: наличие на хромозомни аберации в митотичните клетки, нарушена структура и/или функция на делителното вретено, наличие на микроядра в интерфазните клетки и други (Fiskesjö, 1985; Evandri *et al.*, 2000; Rank, 2003; Sarhan, 2010; Sousa *et al.*, 2010).

Информацията получена от изследванията с растителен тест-обект не е достатъчна, за да се направи коректна оценка на влиянието на тестваната субстанция върху околната среда и човека. Директното тестване на химичните съединения върху човека е невъзможно, затова се използват моделни системи. Най-подходящи за интерпретация на резултатите към човека са лабораторните животни (WHO, 1985; Würzler, 1991; Téllez *et al.*, 2001; Topashka-Ancheva, 2003; Tweats *et al.*, 2007; Hayes *et al.*, 2011). Хромозомните аберации, определяни в клетки от костен мозък са чувствителен индикатор за установяване на генотоксичния ефект на изследваните субстанции (Roldan-Arjona *et al.*, 1991). Предимство на теста за хромозомни аберации в клетки от костен мозък е, че се изследват метафазни клетки и се описват отделните видове структурни хромозомни аберации.

За установяване на специфичните свойства на нови продукти на фармакологичната и химичната промишленост най-подходящи са *in vitro* клетъчните тест-системи. При изследванията с тях се осъществява много добър контрол на дозата, получена от отделната клетка, което е важно при определяне на връзката доза/отговор. Освен това не съществува проблемът със специфичния индивидуален отговор (Bhanushali *et al.*, 2010). Клетъчните култури позволяват лесно проучване на

механизмите на действие на изследвана субстанция. Особено ценни са човешките клетъчните линии с патогенен произход. Тяхното изключително предимство е, че предлагат възможността терапевтичната ефективност на потенциалните нови лекарства да бъде оценена директно върху човешки клетки (Davila *et al.*, 1998; Wobus, Löser, 2011).

Нашата хипотеза е, че Vg-oxph ще повлияе върху процеса на митотично делене на клетките. Това влияние би могло да причини промени в темпа на клетъчно делене, нарушения във формирането на делителния апарат на клетката и целостта на хромозомите. Активността на изследваното съединение вероятно ще зависи, както от използвания тест-обект, така и от прилаганата концентрация/доза.

В настоящата работа са използвани четири моделни еукариотни тест-обекта:

- ✓ семена от мека пшеница *Triticum aestivum* L.;
- ✓ семена от обикновен лук *Allium cepa* L.;
- ✓ бели лабораторни мишки;
- ✓ човешки туморни клетки.

Изследванията върху генотоксичната активност на Vg-oxph ще допринесат за изясняване на механизмите на действие на оксафосфолите върху генетичния апарат на митотични клетки от растителен обект (*Allium cepa* L.), животински обект (бели лабораторни мишки) и от човек (туморни клетки от бял дроб). Получените резултати ще покажат възможностите за практическо приложение на това съединение и ще позволят да се направи оценка на риска за човешкото здраве и за опазването на околната среда.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се анализира генотоксичното и цитотоксично влияние на *4-bromo-N,N-diethyl-5,5-dimethyl-2,5-dihydro-1,2-oxaphosphol-2-amine2-oxide* върху митотични клетки на еукариотни тест-обекти.

За постигане на така зададената цел са поставени следните задачи:

1. Да се изследва токсичността на Br-oxph върху мека пшеница *Triticum aestivum* L. и да се определи концентрацията, при която се наблюдава 50%^{-но} инхибиране на растежа на корена (EC50).
2. Да се изследва генотоксичното и цитотоксично влияние на Br-oxph върху клетки от коренова меристема на *Allium cepa* L.
3. Да се изследва кластогенното и цитотоксично влияние на Br-oxph върху клетки от костен мозък на бели лабораторни мишки.
4. Да се направи сравнителен анализ на наблюдаваните със светлинен микроскоп и на установените с атомно-силов микроскоп хромозомни аберации и гепове, индуцирани от Br-oxph в клетки от костен мозък на бели лабораторни мишки.
5. Да се изследва влиянието на Br-oxph върху преживяемостта и пролиферативната активност на белодробни туморни клетки от клетъчна линия SK-MES-1 и да се определи концентрацията, при която се наблюдава 50%^{-но} инхибиране на виталността и пролиферативната активност на клетките (IC50).
6. Да се направи оценка на потенциала на Br-oxph да индуцира апоптоза в белодробни туморни клетки от клетъчна линия SK-MES-1.

IV. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

За изпълнение на задачите, поставени в настоящия дисертационен труд беше приложен комплексен подход. Протоколите за всички методи са описани подробно в дисертацията:

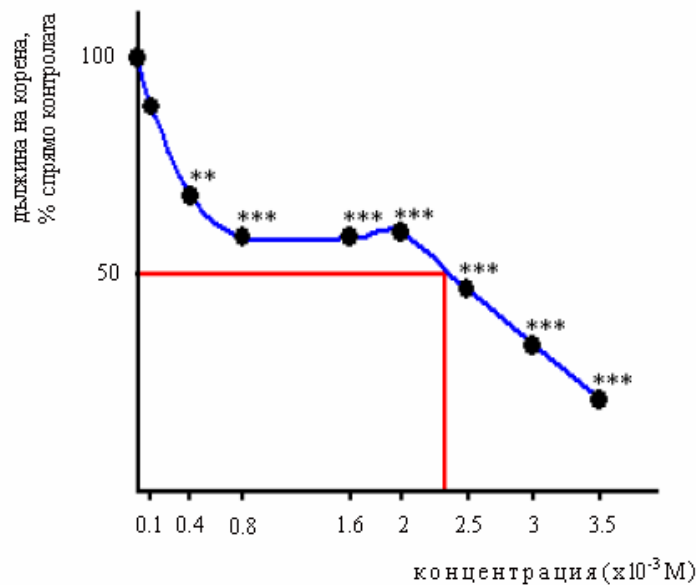
1. Тест за токсичност въз основа на влиянието върху растежа на корен от семена на културно растение
2. Тест за оценка на генотоксичното и цитотоксично действие върху меристемни клетки от корен. *Allium cepa*-тест
3. Тест за хромозомни аберации в клетки от костен мозък на лабораторни мишки
4. Сравнителен анализ на хромозомните аберации наблюдавани със светлинен микроскоп и установени с атомно-силов микроскоп;
5. Тест за виталност и пролиферативна активност на човешки туморни клетки (съгласно инструкциите на производителя);
6. Имунологичен тест за индуциране на апоптоза в човешки туморни клетки (съгласно инструкциите на производителя);
7. Вариационно-статистическа обработка на експерименталните данни: *t*-критерий на Стюдънт и методът χ^2 .

V. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Оценка на токсичността на Bг-охрh върху *Triticum aestivum* L. посредством инхибиране на кореновия растеж

Токсичността на химичните съединения често се представя чрез концентрацията EC50. Това е тази концентрация на изследваното съединение, която предизвиква 50% по-ниски стойности на отчитания показател в сравнение с контролата. EC50 намира приложение като първа стъпка в токсикологичните изследвания на различни лекарства (Muñoz *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2010) и ксенобиотици (Schuler *et al.*, 2005; Samuel *et al.*, 2010; Sinkkonen *et al.*, 2010).

В настоящото изследване тестът за оценяване на токсичността на Bг-охрh и за определяне стойността на EC50 е проведен с обект мека пшеница *Triticum aestivum* L. Степента на токсичност на тестваното съединение е установена посредством инхибиращото му влияние върху кореновия растеж на прорастващи семена (Фиг. 20).



Фиг. 20. Инхибиране растежа на корен от семена на мека пшеница *Triticum aestivum* L. след 96 часово въздействие с различни концентрации на Bг-охрh.

** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$

Анализът на резултатите показва, че в избрания диапазон от концентрации Bг-охрh повлиява процеса на нарастване на корена на мека пшеница. Това влияние се изразява в инхибиране на кореновия растеж, нарастващо с увеличаване на концентрацията. В концентрация 0.1×10^{-3} M Bг-охрh слабо потиска нарастването на корена. Средната дължина на корена е с около 11% по-ниска от тази в контролната група (разликата не е статистически достоверна). При въздействие с концентрации над 0.4×10^{-3} M наблюдаваните разлики са

статистически достоверни ($P \leq 0.001$). В интервала от 0.4×10^{-3} М до 2×10^{-3} М Вг-охрh показва сравнително еднаква степен на подтискане на растежа – от 32% до 41 %, а в интервала от 2×10^{-3} М до 3.5×10^{-3} М се наблюдава линейна зависимост – с увеличаване на концентрацията намалява нарастването на корена (от 54% до 79%). Установено е, че стойността на ефективната концентрация, която причинява 50%^{-но} инхибиране на растежа на корена спрямо контролата (EC50) е 2.3×10^{-3} М. Тези резултати са в съответствие с данните за други оксафосфолни съединения, които в концентрация 1×10^{-3} М подтискат растежа на корена на пшеница (Enchev *et al.*, 1986; Калчев и съавт., 2005; Енчев и съавт., 2006). Нашите резултати също така показват, че меката пшеница е чувствителен тест-обект при оценка на токсичността на Вг-охрh. Тя е предпочитан тест-обект в различни изследвания. Например, при оценка на цитогенетичните ефекти от действието на хербицида логран (Каумак, Muranli, 2006) и отпадните води от производството на зехтин (Aybeke *et al.*, 2008) върху митотични меристемни клетки от мека пшеница.

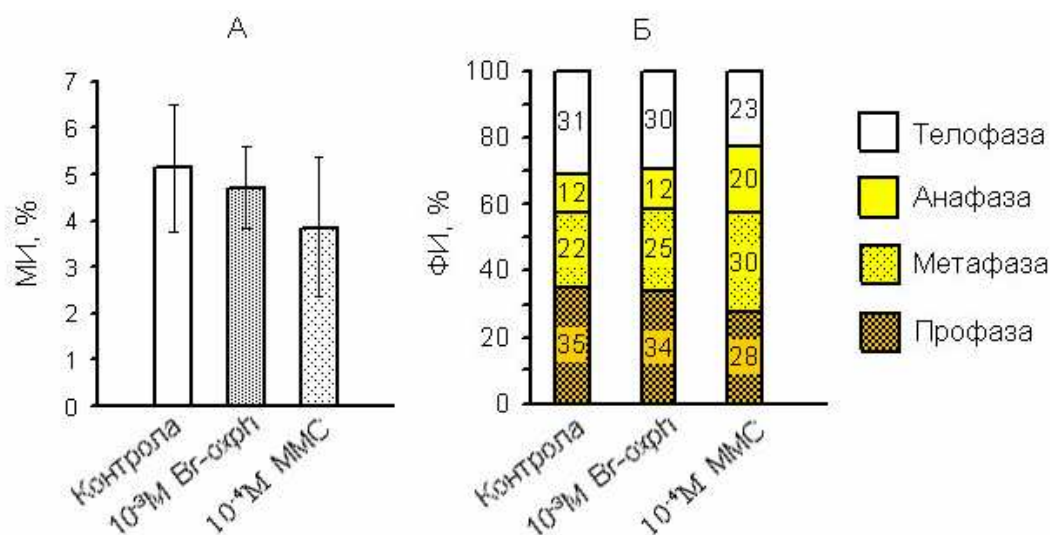
Както се вижда от представените данни, в концентрации над 2×10^{-3} М Вг-охрh оказва ясно изразено токсично действие спрямо *Triticum aestivum* L. С помощта на графиката, отразяваща зависимостта между концентрацията на третиране, и дължината на първичния корен, е определена стойността на концентрацията, при която се наблюдава 50%^{-но} инхибиране на растежа на корена (EC50) – 2.3×10^{-3} М.

2. Определяне на генотоксичните и цитотоксични ефекти на Вг-охрh в концентрация 10^{-3} М след 24 ч. и 48 ч. въздействие в *Allium cepa* L.

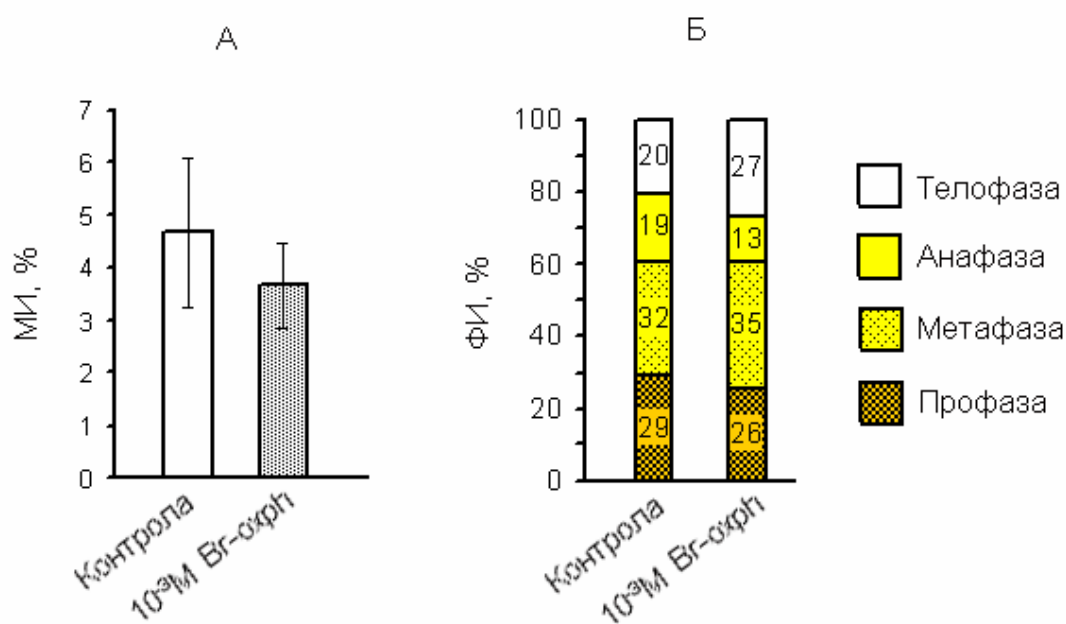
Както беше изтъкнато в литературния обзор, *Allium cepa* L. ($2n = 16$) е най-често използвания растителен тест-обект при оценка на генотоксичния и цитотоксичния потенциал на химичните съединения. За оценяване на генотоксичната и цитотоксична активност на Вг-охрh са използвани показателите митотичен индекс, индекс на всеки стадий на митоза, процент на митотични клетки с нарушения и процент на интерфазни клетки с нарушения (Fiskesjö, 1985; Egito *et al.*, 2007). Продължителността на третиране беше 24 часа и 48 часа, включващи съответно един и два клетъчни цикъла (Rank, 2003; Konuk *et al.*, 2007; Yüzbaşıoğlu *et al.*, 2009; Sarhan, 2010; Sreeranjini, Siril, 2011). И в двата периода на третиране *Allium cepa*-теста беше проведен с използването на концентрация 10^{-3} М. Тази концентрация е приблизително 1/2 от стойността на установената от нас EC50 и е най-високата използвана концентрация в изследвания относно биологичната активност на други оксафосфолни съединения (Енчев и съавт., 2006; Калчев и съавт., 2005).

На Фиг. 21 са представени резултатите относно влиянието на Вг-охрh върху митотичния индекс и честотата на митотичните фази. Митотичният индекс след 24 часов период на третиране е с около 8% по-нисък от този на контролата. Фазовите индекси,

показващи честотата на клетките в отделните фази на митоза не се отличават съществено от съответните в контролната група. След 48 ч. период на въздействие с Вг-охрh митотичният индекс е с 22% по-нисък в сравнение с контролата (Фиг. 22). Наблюдаваните разлики не са статистически достоверни.



Фиг. 21. Влияние на третирането с 10^{-3} М Вг-охрh в продължение на 24 часа върху митотичния индекс (А) и фазовите индекси (Б) на меристемни клетки от корен на *Allium cepa* L. МИ – митотичен индекс, ФИ – фазов индекс, Контрола – дестилирана вода, ММС – Метил метан сулфонат, *P≤0.05



Фиг. 22. Влияние на третирането с 10^{-3} М Вг-охрh в продължение на 48 часа върху митотичния индекс (А) и фазовите индекси (Б) на меристемни клетки от корен на *Allium cepa* L. Контрола – дестилирана вода, МИ – митотичен индекс, ФИ – фазов индекс, *P≤0.05

Подтискането на митотичната активност е един от показателите за цитотоксичност (Smaka-Kincl *et al.*, 1996; Konuk *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2010; Olorunfemi *et al.*, 2011). Получените от нас резултати показват, че Br-oxph проявява митодепресивен ефект. Този ефект нараства с увеличаване на продължителността на периода на третиране. Резултатите са в съответствие и с получените от нас данни относно влиянието на Br-oxph върху растежа на корена при мека пшеница.

Както беше отбелязано в литературния обзор на настоящата работа, цитогенетичните тестове не дават яснота относно молекулярния механизъм на възникване на различните видове отклонения в митотичния процес. Но резултатите от молекулярните изследвания безспорно доказват, че наблюдаваните цитогенетични показатели са резултат от разнообразни генни мутации. Поради това, днес показателите свързани с нарушения на формирането и функцията на делителното вретено (многополюсна анафаза/телофаза, странстващи хромозоми и К-митоза) и показателите свързани с нарушения на целостта на хромозомите (анафазен/телофазен мост и фрагменти) се представят заедно.

В Таблица 1 са представени резултатите относно влиянието на Br-oxph в концентрация 10^{-3} M върху честотата на анормалните митотични клетки. Данните показват, че изследваният от нас оксафосфол оказва негативно влияние върху дялящите се клетки. И в двете експериментални групи процента на клетките с нарушения е увеличен. След 24 часов период на третиране тези клетки са около три пъти повече, а след 48 часов – около два пъти повече в сравнение със съответната контрола. Най-често срещаните нарушения са анафазните и телофазни клетки със странстващи хромозоми и с анафазен мост от хроматиден тип (Фиг. 23). Наличието на митотични клетки със странстващи хромозоми показва, че изследваното от нас съединение възпрепятства свързването на някои от нишките на делителното вретено с кинетохора на хромозомите. Съгласно McClintock (1984), когато слепването на два разкъсани края на ДНК протече след ДНК репликацията, се формира анафазен мост от хроматиден тип. След въздействие с Br-oxph установените анафазни мостове са само от хроматиден тип, което показва, че са формирани след S-фаза на клетъчния цикъл.

Анализът на данните, представени в Таблица 1, показва, че в концентрация 10^{-3} M Br-oxph има ясно изразен генотоксичен ефект. Същественото повишаване на честотата на дялящи се клетки с аберации се приема като един от сигурните показатели за генотоксичния потенциал на изследваните съединения (Evandri *et al.*, 2000; Rank, 2003; Santos *et al.*, 2009; Dragoeva *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2010; Olorunfemi *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011). Странстващите хромозоми се наблюдават, когато не е осъществена връзка между кинетохората на хромозомата и нишката на делителното вретено (Michel *et al.*, 2001; Silkworth *et al.*, 2009). Анафазен/телофазен мост се образува, когато две хромозоми с липсващи теломерни участъци се съединят (McClintock, 1984; Luo *et al.*, 2004; Bailey,

Cornforth, 2007). В резултат от разкъсването на такъв мост между полюсите на митотичното вретено могат да останат хромозомни фрагменти. Тези нарушения обикновено са свързани със загуба на генетичен материал (Ivanova *et al.*, 2005).

Таблица 1

Влияние на третирането с 10^{-3} М Вг-охрh в продължение на 24 часа и 48 часа върху честотата на митотични клетки с нарушения

Проба	Анализирани клетки, (общ брой)	МП (общ брой)	СХ (общ брой)	КМ (общ брой)	АМ (общ брой)	ХФ (общ брой)	Среден % ($\bar{X} \pm \sigma$)
Време на третиране – 24 ч.							
ОК	196	0	1	0	2	1	2.40 ± 3.85
10^{-3} М	183	0	5	3	4	2	$8.26 \pm 4.26^*$
ПК	156	10	16	0	6	1	$20.30 \pm 11.27^{**}$
Време на третиране – 48 ч.							
ОК	178	0	3	0	2	0	2.70 ± 2.96
10^{-3} М	141	0	6	0	2	0	5.23 ± 5.40

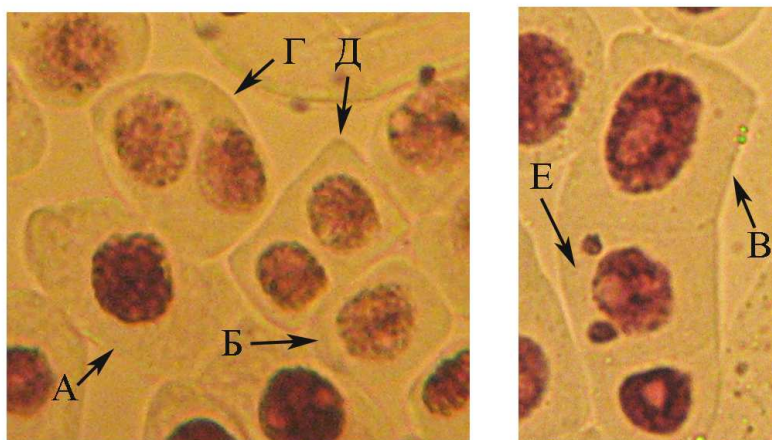
ОК – отрицателна контрола (дестилирана вода), ПК – положителна контрола (ММС, 10^{-4} М), МП – многополюсна анафаза/телофаза, СХ – странстващи хромозоми, КМ – К-митоза, АМ – анафазен мост, ХФ – хромозомен фрагмент, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$



Фиг. 23. Митотични клетки от коренова меристема на *Allium cepa* L. след въздействие с 10^{-3} М Вг-охрh: А – нормална анафаза, Б – анафаза със странстваща хромозома

След 24 часов и 48 часов период на третиране с Вг-охрh е установено наличие на интерфазни клетки с нарушения. Преобладават клетките с две ядра, но са наблюдавани и интерфазни клетки с микроядра (Фиг. 24). Честотата на тези клетки е около седем пъти повече в сравнение с контролните (Таблица 2). Наличието на двуядрени клетки е признак за

цитотоксичност, тъй като възникват когато не протича процеса цитокинеза (Saxena *et al.*, 2004; Li, *et al.*, 2007a; Chakraborty *et al.*, 2008; Sarhan, 2010).



Фиг. 24. Интерфазни клетки от коренова меристема на *Allium cepa* L. след въздействие с 10^{-3} М Vg-охрh: А, Б и В – нормални интерфазни клетки с едно ядро и без микроядра, Г и Д – интерфазни клетки с две ядра, Е – интерфазна клетка с две микроядра

Таблица 2

Влияние на третирането с 10^{-3} М Vg-охрh в продължение на 24 часа и 48 часа върху честотата на срещане на аномални интерфазни клетки в коренова меристема на *Allium cepa* L.

Проба	Анализирани клетки (общ брой)	ДЯ (общ брой)	МЯ (общ брой)	Среден % ($\bar{X} \pm \sigma$)
Време на третиране – 24 ч.				
ОК	3645	1	7	0.19 ± 0.13
10^{-3} М	3695	38	9	1.28 ± 1.35
ПК	3856	18	21	$1.11 \pm 0.73^{**}$
Време на третиране – 48 ч.				
ОК	3638	1	2	0.08 ± 0.14
10^{-3} М	3714	14	6	$0.55 \pm 0.36^*$

ОК – отрицателна контрола (дестилирана вода); ПК – положителна контрола (ММС, 10^{-4} М); ДЯ – двуядрени клетки; МЯ – клетки с микроядра; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$

В заключение, нашите изследвания показват, че след 24 ч. и 48 ч. въздействие в концентрация 10^{-3} М, Vg-охрh проявява генотоксичен и цитотоксичен ефект спрямо меристемни клетки от корен на *Allium cepa* L.

3. Определяне на генотоксичните и цитотоксични ефекти на Вг-охрн след 3 часов период на въздействие и след период на възстановяване от 24 ч. и 48 ч. в *Allium cepa* L.

Резултатите, представените в точка V.2. на настоящата работа, показват че след третиране в продължение на 24 ч. и 48 ч. Вг-охрн проявява генотоксичен и цитотоксичен ефект спрямо митотични клетки от *Allium cepa* L. Съществуват данни, че първата поява на изменения в структурата на ДНК се наблюдават след много по-кратък период на третиране. Miyamae *et al.* (1997) установяват първите изменения в ДНК след 3 часов период на третиране на лимфомни клетки от мишки. Bellini *et al.* (2006) също установяват генотоксична активност след 3 ч. третиране с екстракт от *Agaricus blazei (in vitro)*. Williams, Otoh (1996) доказват митодепресивен ефект и някои митотични нарушения в клетки от корен на *Allium cepa* третирани с екстракт от *Cymbopogon citratus* за 3 ч. При *Allium cepa*-тест е установено, че авеноксан (Gul *et al.*, 2006) и магнезиев сулфат (Bhatta, Sakya, 2008) проявяват цитостатичен и кластогенен ефект след третиране в продължение на 3 ч. Поради това беше изследвано генотоксичното и цитотоксично действие на Вг-охрн върху митотични клетки на *Allium cepa* L. след 3 часов период на третиране.

Както продължителността на периода на третиране, така и продължителността на периода за възстановяване след въздействие с химично съединение е важен показател при изучаване на неговата генотоксична и цитотоксична активност. Поради това след 3 часовия период на действие на Вг-охрн беше направена оценка и на генотоксичните и цитотоксични ефекти след последващи:

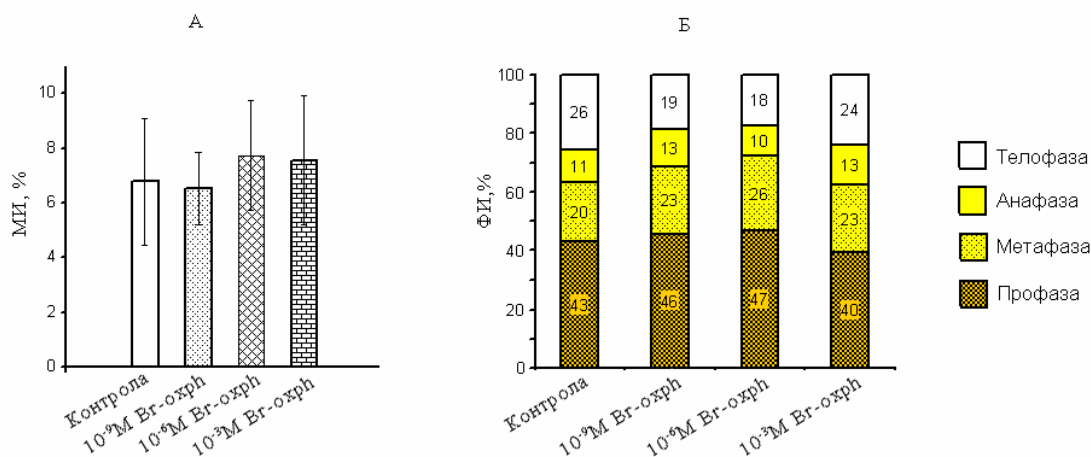
- ✓ 24 часов период на възстановяване, включващ един клетъчен цикъл и
- ✓ 48 часов период на възстановяване, включващ два клетъчни цикъла.

Предишни изследвания показват, че в концентрации от 10^{-3} М до 10^{-9} М някои оксафосфоли повлияват нарастването на корена на културни растения (Enchev *et al.*, 1986; Калчев и съавт., 2005) и процеса на митотично делене на клетки от корен на *Allium cepa* L. (Енчев и съавт., 2006). Поради това беше направена оценка на генотоксичното и цитотоксично действие на Вг-охрн върху меристемни клетки от корен на *Allium cepa* L в концентрации 10^{-3} М, 10^{-6} М и 10^{-9} М.

3.1. Определяне на влиянието на Вг-охрн върху темпа на клетъчно делене на митотични клетки от корен на *Allium cepa* L.

На Фиг. 25 са представени резултатите относно 3 часовото влияние на Вг-охрн върху темпа на клетъчно делене изразен чрез митотичния индекс и честотата на митотичните фази на меристемни клетки от *Allium cepa* L. МИ на контролната група клетки е 6.79%. Три часовото въздействие с Вг-охрн не повлиява съществено темпа на клетъчна пролиферация.

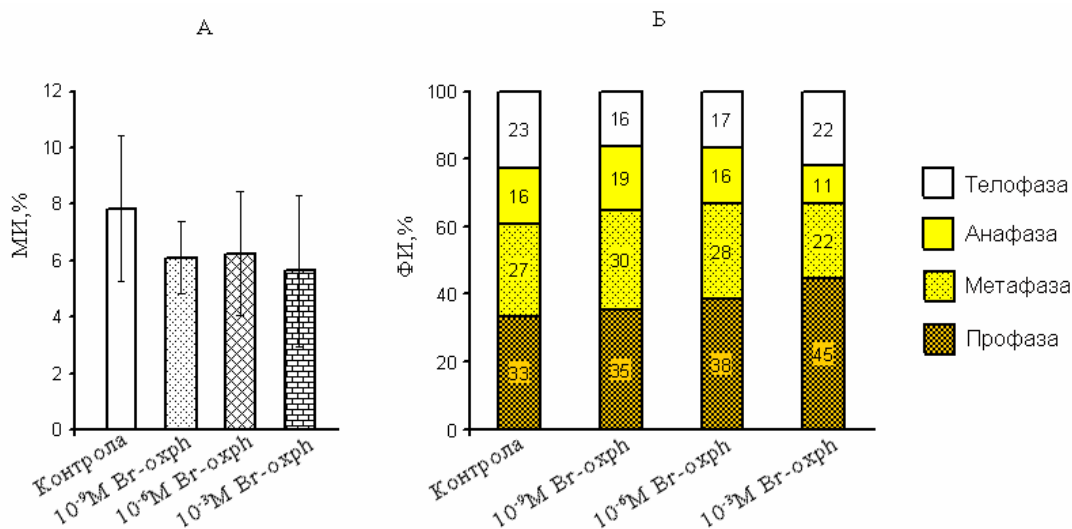
След въздействие с концентрация 10^{-9} М стойността на МИ е 6.54%, а с 10^{-6} М и 10^{-3} М е съответно – 7.72% и 7.56%. Вг-охрh не повлиява съществено и честотата на клетите в отделните фази на митоза. Единствено ФИ на телофаза след въздействие с 10^{-9} М и 10^{-6} М е по-нисък от този на контролата. Незначителното повишаване на стойностите на МИ в концентрации 10^{-3} М и 10^{-6} М може да е резултат от процеса митотично „заспиване”. Например, Brito, Rieder, (2006) изказват предположението, че след добавяне на 400 nM (4×10^{-7} М) нокодазол в средата продължителността на митоза на клетки от кенгуров плъх се повишава от 33 мин. до 191 мин. в резултат на митотично „заспиване”.



Фиг. 25. Влияние на 3 часовия период на третиране с Вг-охрh върху (А) митотичния индекс (МИ) и (Б) фазовите индекси (ФИ) на меристемни клетки от корен на *Allium cepa* L. Контрола – дестилирана вода, * $P \leq 0.05$

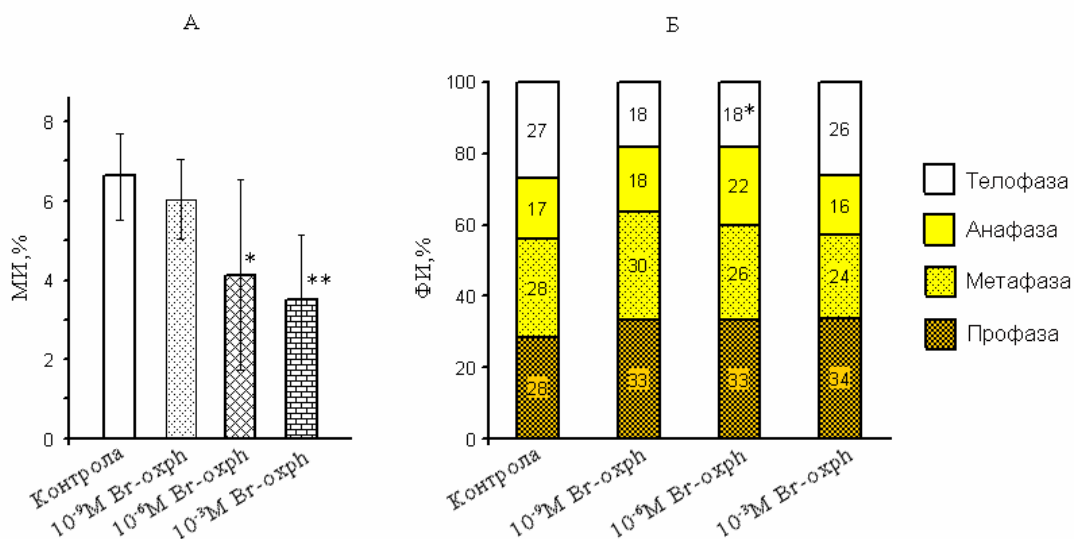
Сравнителният анализ на различната продължителност на действие на Вг-охрh (3 ч., 24 ч. и 48 ч.) в концентрация 10^{-3} М (Фиг. 21, Фиг. 22 и Фиг. 25) показва линейна зависимост – с нарастване на времето на третиране намалява стойността на МИ. Тези резултати са в съответствие с данните от други изследвания, показващи линейна зависимост между продължителността на третиране и негативния ефект на тестваната субстанция върху интензитета на клетъчно делене (Gul *et al.*, 2006; Konuk *et al.*, 2007; Bhatta, Sakya, 2008).

Двадесет и четири часа след 3 часовия период на въздействие с Вг-охрh е установено инхибиране на клетъчната пролиферация (Фиг. 26). Стойностите на МИ във всички експериментални групи са от 20% до 28% по-ниски от тези на контролата. Анализът на ФИ показва незначителна промяна в честотата на клетките в отделните фази на митоза. Изключение са ФИ на телофаза при 10^{-9} М и 10^{-6} М, които имат по-ниски стойности от този на контролата.



Фиг. 26. Влияние на 24 часовия период на възстановяване след 3 часова третиране с Br-oxrh върху (А) митотичния индекс (МИ) и (Б) фазовите индекси (ФИ) на меристемни клетки от корен на *Allium cepa* L. Контрола – дестилирана вода, *P ≤ 0.05

В края на 48 часовия период на възстановяване е установено понижаване в интензивността на клетъчното делене и при трите изследвани концентрации (Фиг. 27). В концентрации 10⁻⁹ M и 10⁻⁶ M Br-oxrh намалява съществено честотата на клетите в телофаза. Разликата е достоверна само при концентрация 10⁻⁶ M. Честотата на клетките в останалите фази на митоза е слабо променена.



Фиг. 27. Влияние на 48 часов период на възстановяване след 3 часова третиране с Br-oxrh върху (А) митотичния индекс (МИ) и (Б) фазовите индекси (ФИ) на меристемни клетки от корен на *Allium cepa* L. Контрола – дестилирана вода, *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01

Анализът на стойностите на митотичния индекс показват, че 3 часовия период на третиране с Вг-охрh, последван от 24 часов и 48 часов период на възстановяване, е достатъчен за да бъде повлияна клетъчната пролиферация. Williams, Omoh (1996) установяват митодепресивен ефект 3 ч. след третиране на меристемни клетки на *Allium cepa* L. с екстракт от *Cymbopogon citratus*. Ефектът се запазва след 24 ч. възстановяване във вода. Спадът в темпа на клетъчно делене с увеличаване на времето за възстановяване, показва, че ефекта от третирането се запазва няколко клетъчни цикъла (Vicentini *et al.*, 2001; Srivastava, Mishra, 2009). Според Badr, Ibrahim (1987) по-ниските стойности на митотичния индекс показват, че изследваното съединение възпрепятства способността на клетките да встъпят в митоза. Промяната в продължителността на нормалния клетъчен цикъл може да е резултат от спиране синтеза на ДНК, блокиране в G₂ периода от клетъчния цикъл (Türkoğlu, 2007; Kwankua *et al.*, 2010), нарушения при формирането на микротубулите (Yüzbaşıoğlu *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2011) или намаляване нивата на АТФ (Jain, Andsorbhoy, 1988).

Резултатите от проведеното изследване показват, че Вг-охрh проявява митостатичен ефект 24 ч. и 48 ч. след края на 3 часов период на въздействие.

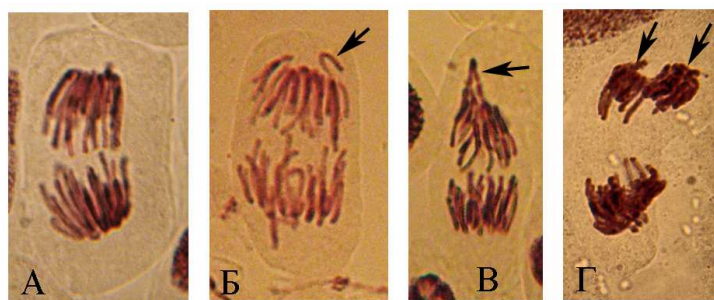
3.2. Определяне на влиянието на Вг-охрh върху честотата на митотичните клетки с нарушения

В Таблица 3 са представени резултатите относно влиянието на Вг-охрh върху митотичните клетки след 3 часов период на въздействие. Данните показват висок процент на аномални митотични клетки във всички експериментални групи. Нарушенията свързани с формирането и функциите на делителното вретено са най-често срещания вид. Установено е наличие на странстващи хромозоми и на многополюсно делително вретено (Фиг. 28). Също така са наблюдавани К-митози, анафазни мостове от хроматиден тип и хромозомни фрагменти, но с по-ниска честота.

Таблица 3
Влияние на третирането с Вг-охрh в продължение на 3 часа върху честотата на митотичните клетки с нарушения

Проба	Анализирани клетки, (общ брой)	МП (общ брой)	СХ (общ брой)	КМ (общ брой)	АМ (общ брой)	ХФ (общ брой)	Среден % ($\bar{X} \pm \sigma$)
ОК	269	2	1	0	0	1	1.94 ± 1.13
10 ⁻⁹ М	257	15	12	1	2	3	12.64 ± 8.06**
10 ⁻⁶ М	304	0	9	0	3	2	4.71 ± 3.64
10 ⁻³ М	300	2	1	5	1	3	4.24 ± 3.02

ОК – отрицателна контрола (дестилирана вода), МП – многополюсна анафаза/телофаза, СХ – странстваща хромозома, КМ – К-митоза, АМ – анафазен мост, ХФ – хромозомен фрагмент, **P<0.01



Фиг. 28. Митотични клетки от коренова меристема на *Allium cepa* L. след 3 часово въздействие с Br-oxph: А – нормална анафаза; Б и В – анафаза със странстваща хромозома; Г – многополюсна анафаза: в единия край на клетката има един полюс, а в другия край на клетката има два полюса

Данните относно различната продължителност на действие на Br-oxph (3 ч., 24 ч. и 48 ч.) в концентрация 10^{-3} М (Таблица 1 и Таблица 3) показват наличие на генотоксична активност. След най-краткия (3 ч.) и след най-продължителния (48 ч.) период на въздействие има два пъти повече аномални митотични клетки в сравнение със съответната контрола. След 24 часа те са три пъти повече. Нелинейна зависимост между времето на третиране и нивото на митотични отклонения е установено и в други изследвания. При генотоксична оценка чрез *Allium cepa*-тест на действието на оловен нитрат Pădureanu (2005) установява, че с увеличаване на периода на третиране (4 ч., 24 ч. и 48 ч.) процента на клетки с митотични отклонения не нараства линейно. Най-висок процент е отчетен в края на 24^{тия} час, а най-нисък след 48 часов период на третиране с оловен нитрат.

След период на възстановяване от 24 ч. след третиране с 10^{-9} М и 10^{-6} М Br-oxph средният брой аномални митотични клетки е около пет пъти повече, отколкото при контролата (Таблица 4). В експерименталната група третирана с концентрация 10^{-3} М процента на тези клетки е около два пъти по-висок в сравнение с контролната. Преобладават нарушения от типа на странстващи хромозоми и многополюсно митотично вретено. К-митози и хромозомни фрагменти се срещат само след третиране с двете най-високи концентрации. Има и отделни клетки с анафазните мостове от хроматиден тип.

Четиридесет и осем часа след края на третирането с Br-oxph честотата на митотичните клетки с отклонения е от осем до десет пъти повече в сравнение с контролата (Таблица 5). Анафазите и телофазите с нарушения в делителното вретено и с странстващи хромозоми са преобладаващите видове нарушения. С по-ниска честота са хромозомните фрагменти и анафазните мостове от хроматиден тип (Фиг. 29). К-митози не са наблюдавани.

Таблица 4

Влияние на 24 часов период на възстановяване след 3 часово третиране с Vg-oxrh върху честотата на митотичните клетки с нарушения

Проба	Анализирани клетки, (общ брой)	МП (общ брой)	СХ (общ брой)	КМ (общ брой)	АМ (общ брой)	ХФ (общ брой)	Среден % ($\bar{X} \pm \sigma$)
Контрола	303	0	3	0	2	1	2.01 ± 2.61
10 ⁻⁹ М	230	15	4	0	1	0	9.45 ± 5.66*
10 ⁻⁶ М	243	9	12	1	3	1	10.34 ± 4.25**
10 ⁻³ М	220	1	6	3	0	2	4.25 ± 4.37

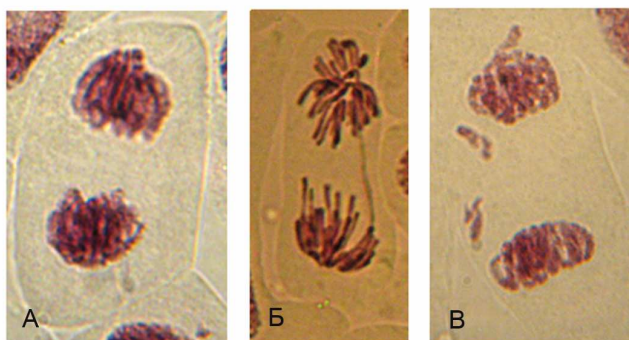
Контрола – дестилирана вода, МП – многополюсна анафаза/телофаза, СХ – странстваша хромозома, КМ – К-митоза, АМ – анафазен мост, ХФ – хромозомен фрагмент, *P≤0.05, **P≤0.01

Таблица 5

Влияние на 48 часов период на възстановяване след 3 часово третиране с Vg-oxrh върху честотата на митотичните клетки с нарушения

Проба	Анализирани клетки (общ брой)	МП (общ брой)	СХ (общ брой)	КМ (общ брой)	АМ (общ брой)	ХФ (общ брой)	Среден % ($\bar{X} \pm \sigma$)
ОК	244	1	2	0	1	0	1.46 ± 1.74
10 ⁻⁹ М	226	15	6	0	3	4	12.39 ± 0.55***
10 ⁻⁶ М	157	9	6	0	4	0	13.24 ± 4.23***
10 ⁻³ М	136	1	8	0	1	0	11.11 ± 12.87

Контрола – дестилирана вода, МП – многополюсна анафаза/телофаза, СХ – странстваша хромозома, КМ – К-митоза, АМ – анафазен мост, ХФ – хромозомен фрагмент, ***P≤0.001



Фиг. 29. Митотични клетки от коренова меристема на *Allium cepa* L. след 3 часово въздействие с Vg-oxrh: А – нормална телофаза, Б – анафазен хроматиден мост, В – телофаза с хромозомни фрагменти

Периодът на полуживот на Vg-oxrh във воден разтвор е повече от 48 ч. Скоростта на разпространение на химичното съединение чрез биотранспорта и способността му да достигне прицелните клетки могат да повлияят върху продължителността на периода на възстановяване на клетките. Установената висока честота на митотични клетки с отклонения след 24 ч. и 48 ч. възстановително време вероятно е резултат от действието на молекули Vg-oxrh, акумулирани в кореновата меристема през 3 часовия период на третиране.

Индуцираните от Vg-oxrh митотични отклонения са предимно анафазни и телофазни клетки с многополюсно делителното вретено и странстващи хромозоми. Формирането на митотичното вретено е ключов етап от процеса на клетъчно делене. Точното разделяне на хромозомите между двете дъщерни клетки е резултат от правилното подреждане на микротубулите на делителното вретено и свързаните с тях белтъци. Получените резултати показват, че два клетъчни цикъла не са достатъчни митотичните клетки на *Allium cepa* L. да се възстановят след 3 часов период на третиране с Vg-oxrh.

Както се вижда от представените данни, след 3 часов период на въздействие, Vg-oxrh проявява генотоксично действие върху меристемни клетки от *Allium cepa* L., като индуцира нарушения с висока честота. След период на възстановяване от 24 ч. и от 48 ч. този ефект е по-силно изразен.

3.3. Определяне на влиянието на Vg-oxrh върху честотата на аномални интерфазни клетки от коренова меристема на *Allium cepa* L.

В Таблица 6 са представени данните относно аномалните интерфазни клетки в коренова меристема на *Allium cepa* L. установени в края на 3 часовия период на третиране с Vg-oxrh. При концентрации 10^{-9} M и 10^{-6} M честотата на интерфазни клетки с две ядра и на интерфазни клетки с микроядра е три-четири пъти повече в сравнение с контролата. Високият процент на аномални интерфазни клетки след въздействие с 10^{-6} M Vg-oxrh е

резултат основно от наличието на двуядрени клетки, а при 10^{-9} М броя на двата вида аномалии е почти еднакъв. След въздействие с 10^{-3} М не е установена увеличена честота на аномални интерфазни клетки.

Таблица 6

Влияние на третирането с Вг-охрh в продължение на 3 часа върху честотата на аномалните интерфазни клетки в коренова меристема на *Allium cepa* L.

Проба	Анализирани клетки (общ брой)	ДЯ (общ брой)	МЯ (общ брой)	Среден %, ($\bar{X} \pm \sigma$)
Контрола	3724	2 (0.05%)	4 (0.11%)	0.16 ± 0.26
10^{-9} М	3656	10 (0.27%)	8 (0.22%)	0.50 ± 0.32
10^{-6} М	3634	20 (0.55%)	3 (0.08%)	0.62 ± 0.55
10^{-3} М	3722	2 (0.05%)	2 (0.05%)	0.11 ± 0.14

Контрола – дистирана вода, ДЯ –клетки с две ядра, МЯ – клетки с микроядра, * $P \leq 0.05$

Анализът на честотата на аномалните интерфазни клетки след различна продължителност на въздействие с 10^{-3} М Вг-охрh (3 ч., 24 ч. и 48 ч.) показва линейна зависимост (Таблица 2 и Таблица 6). След най-краткия период на въздействие (3 ч.) не е установен по-висок процент на клетки с две ядра или с микроядра спрямо контролата. След третиране в продължение на 24 часа и на 48 часа интерфазните клетки с аномалии са седем пъти повече в сравнение със съответната контрола. Клетките с микроядра и двуядрените клетки се наблюдават в дъщерните интерфазни клетки, но са резултат от генотоксично въздействие претърпяно от родителската клетка. Поради това липсата на по-висок процент аномални интерфазни клетки след 3 часов период на третиране не е в противоречие с високия процент аномални митотични клетки в края на този 3 часов период.

В Таблица 7 са представени данните относно честотата на аномалните интерфазни клетки в края на 24 часовия период на възстановяване след 3 часов период на третиране с Вг-охрh. Честотата на аномалните интерфазни клетки се увеличава между два и шест пъти. Разликите с контролата са значими само при концентрация 10^{-3} М. Зависимостта е линейна – с увеличаване на концентрацията на Вг-охрh се увеличава и процента на клетки с две ядра и с микроядра. Като се вижда от Таблица 8, 48 часа след края на 3 часовия период на третиране с Вг-охрh само при концентрация 10^{-9} М се наблюдава увеличена честота на аномални интерфазни клетки в сравнение с контролата. Преобладават клетките с две ядра (Фиг. 30)

Таблица 7

Влияние на 3 ч. третиране с Вг-oxrh и последващи 24 ч. възстановително време върху честотата на аномалните интерфазни клетки в коренова меристема на *Allium cepa* L.

Проба	Анализирани клетки (общ брой)	ДЯ (общ брой)	МЯ (общ брой)	Среден %, ($\bar{X} \pm \sigma$)
Контрола	3563	1	2	0.09 ± 0.09
10 ⁻⁹ М	3545	5	4	0.25 ± 0.39
10 ⁻⁶ М	3640	3	13	0.43 ± 0.63
10 ⁻³ М	3668	11	9	0.54 ± 0.48*

Контрола – дистилирана вода, ДЯ –клетки с две ядра, МЯ – клетки с микроядра, *P≤0.05

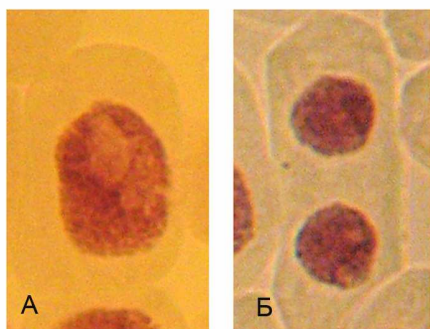
Отчитането на наличие на двуядрени интерфазни клетки е задължителен елемент при провеждането на цитогенетични изследвания, защото те са чувствителен показател за нарушаване на процеса цитокинеза (Chakraborty *et al.*, 2008; Saxena *et al.*, 2004) или за процес водещ до клетъчна смърт (Leme, Marin-Morales, 2009). Наличието на увеличен брой двуядрени клетки в експерименталните групи в сравнение със съответните контролни групи показва, че третирането с Вг-oxrh влияние негативно върху процеса цитокинеза.

Таблица 8

Влияние на 3 ч. третиране с Вг-oxrh и последващи 48 ч. възстановително време върху честотата на аномалните интерфазни клетки в коренова меристема на *Allium cepa* L.

Проба	Анализирани клетки (общ брой)	ДЯ (общ брой)	МЯ (общ брой)	Среден %, ($\bar{X} \pm \sigma$)
Контрола	3454	6	2	0.22 ± 0.29
10 ⁻⁹ М	3522	11	5	0.45 ± 0.54
10 ⁻⁶ М	3626	6	1	0.19 ± 0.48
10 ⁻³ М	3777	1	1	0.06 ± 0.09

Контрола – дистилирана вода, ДЯ –клетки с две ядра, МЯ – клетки с микроядра, *P≤0.05



Фиг. 30. Интерфазни клетки от коренова меристема на *Allium cepa* L. 24 ч. след 3 часово въздействие с Вг-oxrh: А – нормална интерфазна клетка, Б – интерфазна клетка с две ядра

В заключение може да се обобщи, че след 3 часов период на въздействие с Вг-охрh се наблюдава тенденция за промяна в честотата на аномалните интерфазни клетки от меристемни корени на *Allium cepa* L. С увеличаване на периода на възстановяване намалява честотата на аномалните интерфазни клетки.

4. Определяне на генотоксичните и цитотоксични ефекти на Вг-охрh върху митотични клетки от костен мозък на бели лабораторни мишки

Използването на растителни тест-системи намира широко приложение през последните години, поради тенденцията за ограничаване на тестовете с бозайници в токсикологичните изследвания (Asita, Matebesi, 2010). За да бъде направена комплексна оценка на генотоксичното и цитотоксично влияние на определено химично съединение трябва да се използват няколко тест-обекта и метода (Dimitrov *et al.*, 2006; Bakare *et al.*, 2009; Miadokova *et al.*, 2009). Данните от *Allium cepa*-теста показват, че Вг-охрh проявява генотоксично и цитотоксично действие спрямо клетките от кореновата меристема. Информацията получена от изследвания само с растителен тест-обект не е достатъчна, за да се направи оценка на влиянието на тестваната субстанция върху хората. Директното тестване върху човека е невъзможно, затова като моделни обекти се използват лабораторни животни (Roldan-Arjona *et al.*, 1991; Jena *et al.*, 2002; Dimitrov *et al.*, 2006; Bakare *et al.*, 2009; Miadokova *et al.*, 2009; Saxena *et al.*, 2009a). Поради тази причина е проведен и тест за хромозомни аберации в клетки от костен мозък на бели лабораторни мишки.

Тестът за хромозомни аберации в клетки от костен мозък на бели лабораторни мишки често се провежда след тест за остра токсичност и определяне на средната летална доза (ЛД50). За определяне на стойността на ЛД50 са необходими от 100 до 150 лабораторни мишки. В унисон с идея за трите R-а (Replacement, Reduction and Refinement) за хуманност в експерименталните техники не е проведен тест за остра токсичност. Тестът за хромозомни аберации в клетки от костен мозък на бели лабораторни мишки при изследване на генотоксичното и цитотоксично действие на Вг-охрh е проведен въз основа на данните от *Allium cepa*-теста. Резултатите представени в точка V.3 на настоящата работа показват, че в концентрации 10^{-3} М, 10^{-6} М и 10^{-9} М Вг-охрh оказва генотоксично и цитотоксично въздействие върху меристемни клетки от *Allium cepa* L. Съществуват данни за наличие на физиологична активност на някои естествени и синтетични субстанции в диапазона от 10^{-10} М до 10^{-18} М (Sergeeva *et al.*, 1996; Kong *et al.*, 1997; Palmina *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2001; Golovanova *et al.*, 2008). Поради това е направена оценка на генотоксичното и цитотоксично действие на Вг-охрh върху клетки от костен мозък на бели мишки както в концентрации 10^{-3} М, 10^{-6} М, 10^{-9} М, така и в концентрациите 10^{-12} М и 10^{-15} М.

Лабораторните мишки бяха инжектирани с 1 мл разтвор на Вг-охрh (в посочените концентрации) на 100 грама живо тегло. В резултат на този подход изследваните дози са:

2.82×10^3 $\mu\text{g}/\text{kg}$

2.82 $\mu\text{g}/\text{kg}$

2.82×10^{-3} $\mu\text{g}/\text{kg}$

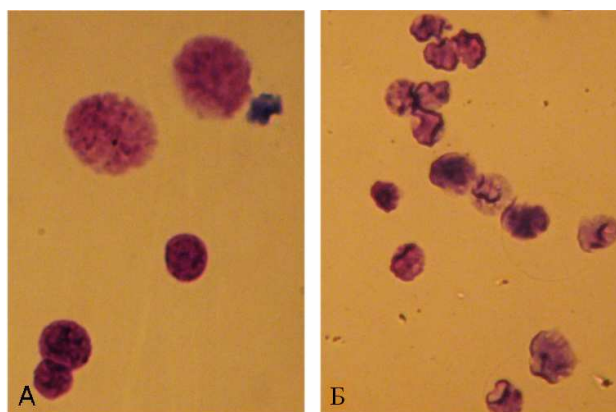
2.82×10^{-6} $\mu\text{g}/\text{kg}$

2.82×10^{-9} $\mu\text{g}/\text{kg}$

Генотоксичното и цитотоксично влияние на Вг-охрh е оценено въз основа на цитогенетичните показатели:

- ✓ митотичен индекс;
- ✓ процент на метафазни клетки със структурни хромозомни изменения;
- ✓ процент на метафазни клетки с геп;
- ✓ процент на тетраплоидни метафази.

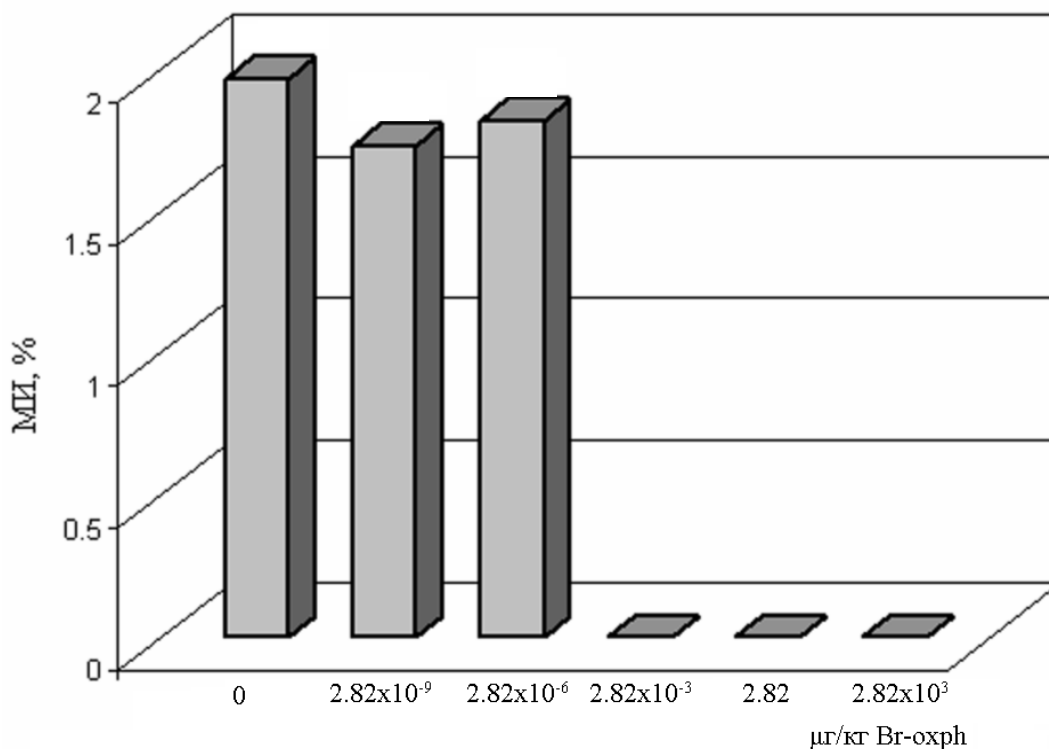
Микроскопският анализ показва, че 3 часа след инжектирането с разтвор на Вг-охрh част от изолираните ядра от клетките от костния мозък на белите мишки са фрагментирани и кондензирани (Фиг. 31). Наблюдаваните от нас морфологични изменения на клетъчните ядра са неочакван резултат. Поради това, цитогенетични показатели са отчетени само при животни, при които преобладаващата част от ядрата имат нормална морфология.



Фиг. 31. Ядра на клетки от костен мозък на бели лабораторни мишки: А – ядра с нормална морфология, Б – ядра с морфологични изменения след третиране с Вг-охрh

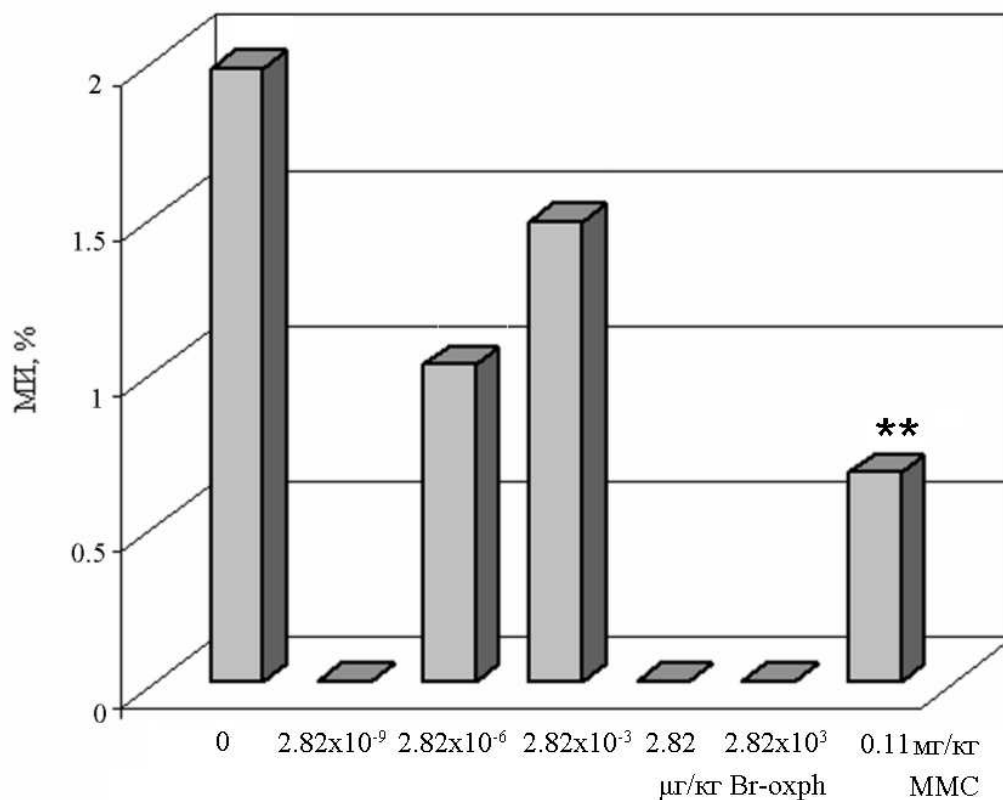
На Фиг. 32 са представени резултатите относно 3 часовото влияние на Вг-охрh върху процеса на клетъчна пролиферация на костно-мозъчни клетки от бели мишки. След анализ на микроскопските препарати цитогенетични показатели са отчетени при 6 животни третирани с 2.82×10^{-9} $\mu\text{g}/\text{kg}$ и при 5 третирани с 2.82×10^{-6} $\mu\text{g}/\text{kg}$. Еднократното третиране с 2.82×10^{-9} $\mu\text{g}/\text{kg}$ Вг-охрh слабо повлиява стойността на МИ – процента на клетките в митоза намалява с 12%, а при доза 2.82×10^{-6} $\mu\text{g}/\text{kg}$ – с 8%. Инхибирането на

процеса на клетъчно делене е индикатор за цитотоксична активност на изследваното химично съединение (Bakare *et al.*, 2009). Anitha *et al.* (1994) изследват *in vivo* генотоксичната активност на пиразинамид, препарат прилаган за лечение на болни от туберкулоза. Авторите също установяват, че 3 часовия период на третиране е достатъчен за да бъде инхибиран темпа на клетъчно делене на клетките от костен мозък на лабораторни мишки.



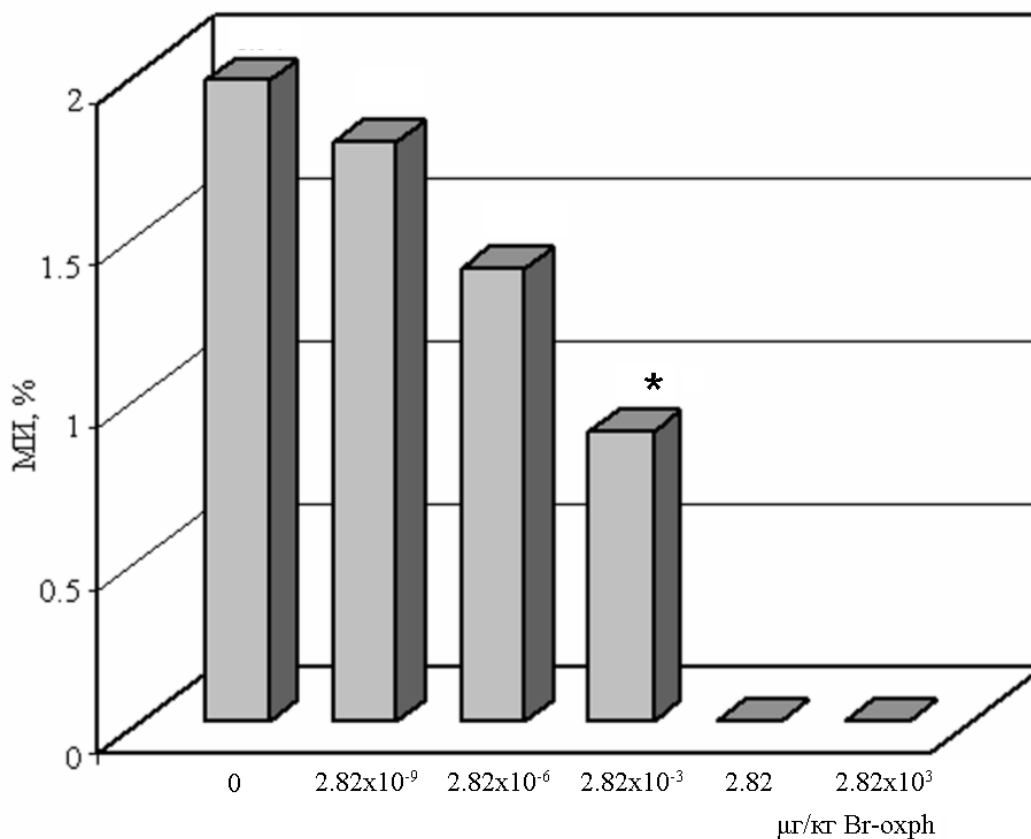
Фиг. 32. Влияние на Br-oxph върху процеса на клетъчна пролиферация на костно-мозъчни клетки от бели мишки след 3 часов период на въздействие. МИ – митотичен индекс, Контрола – 0.9% NaCl, 24 ч.

Двадесет и четири часа след инжектирането с Br-oxph са отчетени цитогенетични показатели при животни от две експериментални групи – 7 третирани с доза от 2.82×10^{-6} µg/kg и 5 с доза от 2.82×10^{-3} µg/kg (Фиг. 33). Стойностите на митотичния индекс са съответно с 48% и с 25% по-ниски от тези на контролата. Четиридесет и осем часа след инжектирането на белите мишки цитогенетични показатели са отчетени при животни от експерименталните групи третирани с доза от 2.82×10^{-9} µg/kg, 2.82×10^{-6} µg/kg и 2.82×10^{-3} µg/kg Br-oxph (Фиг. 34). Резултатите показват, че с увеличаване на дозата намалява процента на дялящите се клетки: при 2.82×10^{-9} µg/kg МИ е само с 10% по-нисък от този на контролата, при 2.82×10^{-6} µg/kg е с 30%, а при 2.82×10^{-3} µg/kg – 55% ($P \leq 0.05$).



Фиг. 33. Влияние на Vg-oxph върху процеса на клетъчна пролиферация на костно-мозъчни клетки от бели мишки след 24 часов период на въздействие. МИ – митотичен индекс, Контрола – 0.9% NaCl, 24 ч., MMC – положителна контрола

При изследване на кластогенния ефект на химиотерапевтичния препарат карбоплатин Al-Etaby, Abou-Tarboush (2004) спрямо костено-мозъчните клетки от лабораторни мишки установяват, че стойността на МИ след 24 ч. е по-ниска в сравнение с контролата. Този митостатичен ефект не е установен 48 ч след инжектирането. Авторите предполагат, че възстановяването на нормалния темп на клетъчно делене може да е свързано с краткия полуживот на лекарството и нестабилността на неговите метаболити, или е резултат от елиминирането му от организма на третираните животни. Данните от нашето изследване показват, че митодепресивния ефект на Vg-oxph върху клетките от костен мозък на мишки се установява на 3^{-тия} час от инжектирането и нараства на 24^{-тия} и 48^{-мия} час. Запазването на този ефект с времето е в съответствие с факта, че във воден разтвор молекулната структура на Vg-oxph остава непроменена в продължение



Фиг. 34. Влияние на Br-oxph върху процеса на клетъчна пролиферация на костно-мозъчни клетки от бели мишки след 48 часов период на въздействие. МИ – митотичен индекс, Контрола – 0.9% NaCl, 24 ч.

на повече от 48 ч. В специализираната литература има данни и за други съединения, които проявяват митодепресивен ефект спрямо костно-мозъчни клетки 24 ч. и 48 ч. след еднократното третиране на лабораторни животни. Seetharama Rao, Narayana (2005) установяват, че митодепресивния ефект на рибавирин (нуклеозиден аналог прилаган при лечението на хепатит С) върху клетките от костен мозък на бели мишки се запазва в продължение на 24 ч. и 48 ч. Хербицидът глифосат също проявява митостатичен ефект 24 ч. и 48 ч. след еднократно третиране на лабораторни мишки (Prasad *et al.*, 2009).

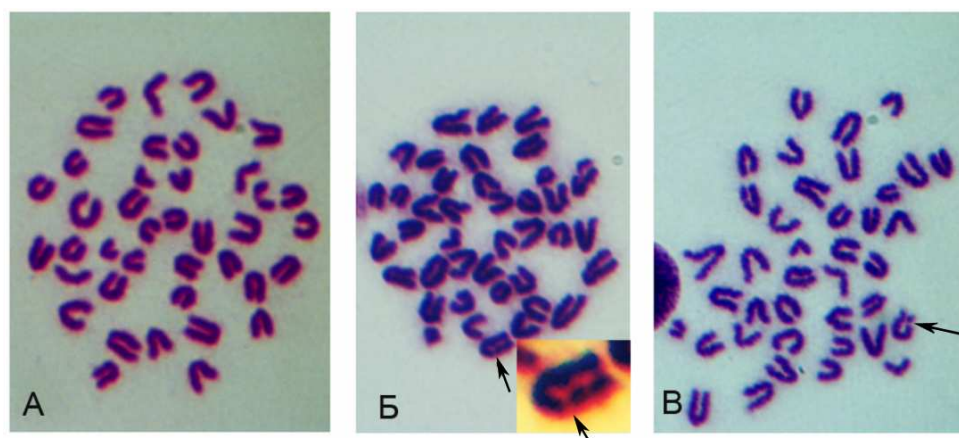
В Таблица 9 са представени данните относно 3 часовия период на въздействие на Br-oxph върху честотата на метафазни клетки с хромозомни аберации, изолирани от костен мозък на бели мишки. И при двете дози е установен четири пъти по-висок процент на клетки с хромозомни аберации от този в контролната група ($P \leq 0.001$). Най-често срещания вид хромозомни аберации са хроматидните разриви (Фиг. 35).

Таблица 9

Ефект от 3 часов период на въздействие на Вг-охрh върху честотата на метафазни клетки с хромозомни аберации, изолирани от костен мозък на бели мишки

Доза (µг/кг)	Анализирани метафази (общ брой)	Видове хромозомни аберации (общ брой)					Метафази с хромозомни аберации ‡, Среден % ($\bar{X} \pm \sigma$)	Метафази с геп, Среден % ($\bar{X} \pm \sigma$)
		ХЗР	ХТР	Ц/Ц	Т/Т	ХФ		
Контрола	500	1	21	1	1	0	4.40 ± 3.10	3.00 ± 2.71
2.82x10 ⁻⁹	300	12	48	2	3	0	18.67 ± 7.23 ***	2.33 ± 2.34
2.82x10 ⁻⁶	250	8	50	0	0	0	18.80 ± 3.35 ***	4.00 ± 2.82
2.82x10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-
2.82	-	-	-	-	-	-	-	-
2.82x10 ³	-	-	-	-	-	-	-	-

Контрола – 0.9 % NaCl, 24 ч.; ХЗР – хромозомно разкъсване; ХТР – хроматидно разкъсване; Ц/Ц – центромерно слепване; Т/Т – теломерно слепване; ХФ – хромозомен фрагмент; ‡ – някои от метафазите са с повече от една хромозомна аберация; *** P≤0.001



Фиг. 35. Хромозомни аберации в клетки от костен мозък на бели лабораторни мишки третиран с Вг-охрh: А – метафазна пластинка без хромозомни аберации, Б – метафазна пластинка с хроматиден геп, В – метафазна пластинка с хроматидно разкъсване

Увеличен процент на метафази с геп по дължината на хромозомите е установен след третиране с 2.82x10⁻⁶ µг/кг (разликата с контролата не е статистически достоверна). В общоприетата класификация на видовете хромозомни аберации (Savage, 1975; Preston *et al.*, 1987) остава недоизяснен въпроса относно природата на т.н. геп. Поради това, в настоящото изследване установените гепове не са включени в групата на хромозомните аберации.

Нашите резултати са в съответствие с данните на други автори, които след 3 часов период на въздействие установяват нарушения в структурата на ДНК (Anitha *et al.*, 1994; Miyamae *et al.*, 1997; Bellini *et al.*, 2006). Miyamae *et al.*, (1997) установяват увреждания в структурата на ДНК в лимфомни клетки от мишки след третиране с метилметан сулфонат, метил нитрозоурея и блеомицин. Bellini *et al.* (2006) също установяват, генотоксичен ефект върху клетки от линията CHO-k1 след третиране с екстракти от *Agaricus blazei* Murrill ss. (Гъбата на боговете). *Agaricus blazei* Murrill ss. се среща в дъждовните гори на Бразилия и намира широко приложение в народната медицина като средство за лечение на редица туморни заболявания и за стимулиране на имунната система.

Високо ниво на хромозомни аберации е установено и 24 ч. след инжектирането на белите мишки с Вг-охр (Таблица 10). Метафазните пластинки с хромозомни аберации са 4 пъти повече след третиране с доза от 2.82×10^{-6} $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($P \leq 0.01$) и 2 пъти повече след третиране с 2.82×10^{-3} $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($P \leq 0.05$) спрямо контролата. Хроматидните разкъсвания са преобладаващия вид хромозомни аберации, но се срещат и хромозомни разкъсвания, центромерни и теломерни слепвания. Само в метафазите на животни третирани с 2.82×10^{-6} $\mu\text{g}/\text{kg}$ се наблюдава увеличен процент на метафази с геп по дължината на хромозомите.

Таблица 10

Ефект от 24 часов период на въздействие на Вг-охр върху честотата на метафазни клетки с хромозомни аберации, изолирани от костен мозък на бели мишки

Доза ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Анализирани метафази, (общ брой)	Видове хромозомни аберации (общ брой)					Метафази с хромозомни аберации †, Среден % ($\bar{X} \pm \sigma$)	Метафази с геп, Среден %, ($\bar{X} \pm \sigma$)
		ХЗР	ХТР	Ц/Ц	Т/Т	ХФ		
Контрола	500	1	21	1	1	0	4.40 ± 3.10	3.00 ± 2.71
2.82×10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	-
2.82×10^{-6}	250	5	45	0	1	0	$16.80 \pm 8.07^{**}$	6.00 ± 5.66
2.82×10^{-3}	350	5	28	2	1	0	$9.14 \pm 3.44^*$	1.71 ± 2.14
2.82	-	-	-	-	-	-	-	-
2.82×10^3	-	-	-	-	-	-	-	-
ММС	400	28	106	1	2	0	$20.44 \pm 8.99^{***}$	2.25 ± 1.98

Контрола – 0.9 % NaCl (отрицателна контрола), 24 ч.; ММС – 0.11 мг/кг (положителна контрола), 24 ч.; ХЗР – хромозомно разкъсване; ХТР – хроматидно разкъсване; Ц/Ц – центромерно слепване; Т/Т – теломерно слепване; ХФ – хромозомен фрагмент; † – някои от метафазите са с повече от една хромозомна аберация; * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$

В Таблица 11 са представени резултатите относно 48 часовия период на въздействие на Вг-охрh върху честотата на метафазни клетки с хромозомни аберации, изолирани от костен мозък на бели мишки. В тези експериментални групи също се наблюдава много висок процент на метафазни пластинки с хромозомни аберации: от 2.5 до 4 пъти повече спрямо контролата. Разликите са статистически достоверни. Най-голям е броят на хромозомите с разкъсване в едната хроматидна, а броят на хромозомите с разкъсвания и в двете хроматиди (хромозомни разкъсвания) е по-малък. В отделни метафази са наблюдавани центромерни слепвания, теломерни слепвания и хромозомни фрагменти. Увеличен процент на метафази с геп по дължината на хромозомите има след третиране с 2.82×10^{-6} $\mu\text{g}/\text{kg}$ и с 2.82×10^{-9} $\mu\text{g}/\text{kg}$ (разликите не са статистически достоверни).

Таблица 11

Ефект от 48 часов период на въздействие на Вг-охрh върху честотата на метафазни клетки с хромозомни аберации, изолирани от костен мозък на бели мишки

Доза ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Анализирани метафази (общ брой)	Видове хромозомни аберации (общ брой)					Метафази с хромозомни аберации ‡, Среден % ($\bar{X} \pm \sigma$)	Метафази с геп, Среден % ($\bar{X} \pm \sigma$)
		ХЗР	ХТР	Ц/Ц	Т/Т	ХФ		
ОК	500	1	21	1	1	0	4.40 ± 3.10	3.00 ± 2.71
2.82×10^{-9}	250	12	32	4	0	0	16.40 ± 6.54 **	4.80 ± 2.28
2.82×10^{-6}	250	6	27	0	3	0	10.80 ± 2.28 ***	6.80 ± 4.38
2.82×10^{-3}	350	4	31	1	0	4	10.80 ± 6.57 *	2.00 ± 1.15
2.82	-	-	-	-	-	-	-	-
2.82×10^3	-	-	-	-	-	-	-	-

Контрола – 0.9 % NaCl; 24 ч.; ХЗР – хромозомно разкъсване; ХТР – хроматидно разкъсване; Ц/Ц – центромерно слепване; Т/Т – теломерно слепване; ХФ – хромозомен фрагмент; ‡ – някои от метафазните пластинки са с повече от една хромозомна аберация; * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$

Данните показват, че генотоксичното действие на Вг-охрh върху клетките от костен мозък на бели лабораторни мишки се запазва 24 ч. и 48 ч. след третирнето им. Подобен резултат е установен и след еднократно третиране с карбоплатин (Al-Etaby, Abou-Tarboush, 2004) и рибавирин (Seetharama Rao, Narayana, 2005). Двадесет и четири часа и 48 ч. след третирнето на мишки с карбоплатин нараства процента на метафази с хромозомни

аберации в костно-мозъчните клетки. След 24 ч. процента на метафазите с хромозомни аберации е по-висок от този след 48 ч. Според авторите намаляването на високия процент на хромозомни аберации във времето е свързано с краткия полуживот на това лекарство и нестабилността на неговите метаболити или е резултат от елиминирането му от тялото на третираното животно. В проведеното от нас изследване кластогенното действие на Vg-oxph се запазва след 48 часа, което вероятно е свързано с продължителността на времето на полуживот на Vg-oxph (повече от 48 ч.).

Както беше посочено, след третиране на бели мишки с Vg-oxph хроматидните разкъсвания са най-често срещания вид структурни хромозомни изменения. Разкъсванията от хромозомен тип се срещат със значително по-ниска честота. Al-Elaby, Abou-Tarboush (2004) установяват, че карбоплатин също индуцира предимно хромозомни аберации от хроматиден тип. Авторите изказват предположението, че хроматидните разкъсвания вероятно са възникнали през S или G₂ периода на интерфаза. Това показва, че кластогенното действие на изследвания от нас оксафосфол е резултат предимно от двойноверижни ДНК-разкъсвания възникнали през S-фаза или G₂ периода на интерфаза. ДВР-ДНК са в основата на молекулярния механизъм на възникване на хроматидните разкъсвания (Bryant, Mozdarani, 2004). Повечето теории за механизма на възникване на хромозомните аберации се основават на хипотезата за директно взаимодействие между кластогенните съединения и ДНК, което е последвано от разкъсване на молекулата на ДНК. По време на митоза непоправените разкъсвания се наблюдават като разкъсвания в метафазните хромозоми (Natarajan, 1993; Jackson, 2002; Forand *et al.*, 2004). Непоправените ДВР-ДНК могат да доведат до висока степен на геномна нестабилност (Jackson, 2002; Lin *et al.* 2010). Оптималният отговор на клетката е да поправи увреждането и така да запази целостта на клетъчния геном и жизнеността на клетката (Attardi, 2005; Lin *et al.* 2010). Уврежданията на молекулата на ДНК активират вътреклетъчни сигнални молекули, в резултат на които започва процес на поправка на ДНК или спира растежа на клетката (Grishin *et al.* 2001). Понякога апоптозата е предпочитаният клетъчен отговор на ДВР-ДНК (Jackson, 2002; Lin *et al.* 2010).

Някои химични съединения, подобно на колхицина, нарушават образуването на делителното вретено. При този вид увреждания клетките влизат в следващата G₁ фаза като тетраплоидни клетки (Levan, 1938; Rieder, Maiato, 2004). Поради това при оценка на генотоксичното и цитотоксично влияние на определено химично съединение трябва да се изследва и влиянието му върху плоидността на клетките. В Таблица 12 са представени данните относно влиянието на Vg-oxph върху честотата на тетраплоидни метафазни клетки, изолирани от костен мозък на бели мишки. Данните от анализа на микроскопските препарати от всички експериментални групи показват, че процента на метафазните клетки с тетраплоиден брой хромозоми не е по-висок от този в контролната група. Тези резултати

ни дават основание да направим заключението, че изследваното от нас съединение няма колхицино-подобно действие. Roh et al. (2008) представят експериментални доказателства, че полиплоидията е промотор на туморогенезата в човешки епителни клетки. Известно е, че много от генотоксичните химични съединения са и карциногени (Walmsley, Billinton, 2011). Изследвания от нас Вг-охрh индуцира висок процент метафази с хромозомни аберации в костно-мозъчните клетки на бели мишки. Липсата на висок процент тетраплоидни метафази и отсъствието на характерната за туморните клетки хиперпролиферация (Attardi, 2005) ни дават основание да предположим, че вероятно Вг-охрh няма канцерогенно действие върху костно-мозъчните клетки на бели мишки.

Таблица 12

Влияние на Вг-охрh върху честотата на тетраплоидни метафазни клетки, изолирани от костен мозък на бели мишки

Доза (µg/kg)	Време на третиране: 3 ч.		Време на третиране: 24 ч.		Време на третиране: 48 ч.	
	Анализирани метафази (общ брой)	Тетраплоидни метафази, Среден % ($\bar{X} \pm \sigma$)	Анализирани метафази (общ брой)	Тетраплоидни метафази, Среден % ($\bar{X} \pm \sigma$)	Анализирани метафази (общ брой)	Тетраплоидни метафази, Среден % ($\bar{X} \pm \sigma$)
Контрола	500	1.20 ± 1.69	500	1.20 ± 1.69	500	1.20 ± 1.69
2.82x10 ⁻⁹	300	1.00 ± 1.10	-	-	250	0.80 ± 1.10
2.82x10 ⁻⁶	250	0.80 ± 1.10	250	0.40 ± 0.89	250	0.80 ± 1.10
2.82x10 ⁻³	-	-	350	0.00 ± 0.00 *	350	0.29 ± 0.76
2.82	-	-	-	-	-	-
2.82x10 ³	-	-	-	-	-	-
ММС	-	-	400	0.44 ± 1.33		

Контрола – 0.9 % NaCl (отрицателна контрола), 24 ч.; ММС – 0.11 мг/кг (положителна контрола), 24 ч.; * P≤0.05

Резултатите от проведения от нас тест за хромозомни аберации показват съответствие с тези, получени от *Allium cepa*-теста. Бяха установени и някои специфични особености във влиянието на изследваното съединение върху растителния и животинския тест-обект. Нарушенията свързани с целостта на хромозомите (формиране на хромозомен мост и/или хромозомни фрагменти през анафаза и телофаза) не са най-често срещаното

отклонение в митотичните клетки от растителния тест-обект, докато високата честота на този вид аберации в дялящите се костно-мозъчни клетки е показател за ясен кластогенен ефект на Вг-охрh върху животинския тест обект.

Необходимо е да отбележим една обща особеност в отговора на двата *in vivo* тест-обекта към третирането с Вг-охрh: висока степен на вариране в индивидуалния отговор. В специализирана литература са описани много примери за вариране в индивидуалния отговор към химично въздействие (Tate *et al.*, 2005; Hoskins *et al.*, 2008; Schnackenberg *et al.*, 2008; Allen, Stewart, 2009; Marsh, van Booven, 2009), включително и на органофосфорни съединения (Martinez *et al.*, 2010). Вероятно, някои индивиди имат по-висок потенциал за възстановяване след въздействие с изследваното от нас съединение. Това е причина някои от установените в нашите изследвания разлики между стойностите на отчитаните показатели при част от експерименталните групи да не са статистически значими спрямо съответната отрицателна контрола. Съгласно OECD (1997) статистическата значимост на резултатите не трябва да е единственият определящ фактор за положителен отговор. Необходимо е първо да бъде обмислено биологичното значение на резултатите, а статистическите методи трябва да бъдат използвани като помощни. Нещо повече, през последните години индивидуалният полиморфизъм и неговото влияние върху ефективността и токсичността на лекарствата са предмет на изследване от специална научна дисциплина – фармакогенетика (Allen, Stewart, 2009). Полиморфизмът на отделния ген има важно значение за ефикасността и токсичността на съответното лекарство. Установен е полиморфизъм в гените кодиращи белтъци, които осъществяват преноса на лекарства през клетъчната мембрана и в гените от системата на цитохром Р450 (Cascorbi, 2006). Въпреки, че не всички имат фенотипни последствия, броят на тези с функционално и клинично значение нараства (Tate *et al.*, 2005; Hoskins *et al.*, 2008; Marsh, van Booven, 2009; Oliveira *et al.*, 2010). Идеята за персонализираната медицина се основава на използването на персонална генетична информация за предвиждане на индивидуалния отговор към лекарствената терапия (Schnackenberg *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2010).

Друга характерна особеност в биологичната активност на Вг-охрh е и ясно изразеното генотоксично влияние в най-ниските изследвани концентрации/дозы. Четиридесет и осем часа след 3 часовото въздействие с 10^{-9} М Вг-охрh честотата на аномалните митотични клетки от *Allium cepa* L. е осем пъти по-висока в сравнение с контролата. Четиридесет и осем часа след инжектирането на белите мишки с 2.82×10^{-9} $\mu\text{g}/\text{kg}$ Вг-охрh честотата на метафите с хромозомни аберации е четири пъти по-висока в сравнение с контролата. Тези резултати са в подкрепа на становището на други автори, според които дори единични молекули от генотоксично съединение могат да индуцират мутации, и поради това дори в много ниски дози някои съединения представляват риск за здравето на човека (Toyoda-Hokaiwado *et al.*, 2010).

От получените резултати може да се направи заключението, че Br-oxph оказва кластогенно и цитотоксично действие върху клетките от костен мозък на бели лабораторни мишки.

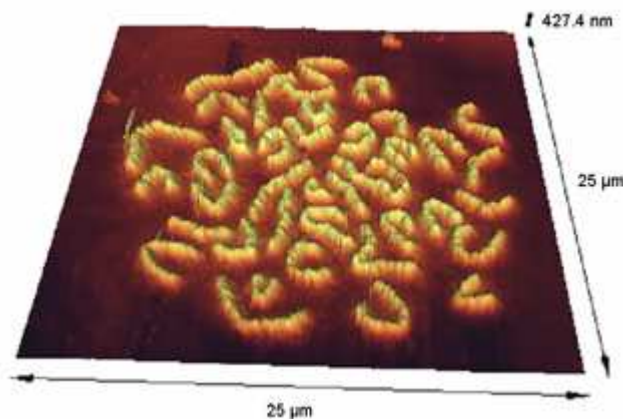
5. Сравнителен анализ на наблюдаваните със светлинен микроскоп и на установените с атомно-силов микроскоп хромозомни аберации и гепове, индуцирани от Br-oxph

Тестът за хромозомни аберации в клетки от бозайници е утвърден и широко използван метод в изследванията относно генотоксичния ефект на химичните съединения. При този тест със светлинен микроскоп (СМ) могат да бъдат наблюдавани почти всички видове хромозомни аберации. В общоприетата класификация на видовете хромозомни аберации (Savage, 1975; Preston *et al.*, 1987) остава неизяснен въпроса относно природата на т.н. хромозомен геп. Прието е гепът да се дефинира като ахроматиново увреждане, като дължината на гепа е по-малка от диаметъра на хроматидата (OECD, 1997; 2001; Savage, 2004) (Фиг. 14). Изясняването на природата на геповете е изключително важен въпрос за генотоксичните изследвания. Huang *et al.* (2009) установяват, че наблюдаваните със светлинен микроскоп гепове могат да са напълно разкъсани участъци от хромозомите или участъци, в които е запазена целостта на ДНК. Това е причина при представянето на резултатите от някои генотоксични изследвания геповете да не са включени в групата на хромозомните аберации (Scheid, Traut, 1971; Gülkaç *et al.*, 2004; Attia, 2008; Albarella *et al.*, 2009), а резултатите от други изследвания включват геповете в групата на хромозомните аберации (Goetz *et al.*, 1975; Galloway *et al.*, 1986; Ito, Ito, 2001; Savage, 2004; Rjiba-Touati, 2012). Приемането или отхвърлянето на геповете като вид хромозомна аберация може да повлияе на резултатите от съответния генотоксичен тест. Поради това Tripathi *et al.* (2011) прилагат комбиниран подход: провеждат статистическия анализ на честотата на метафазните пластинки с хромозомни аберации като включват и като изключват геповете. При изследване на генотоксичното действие на фугицида пропамокарб върху костно мозъчни клетки от мишки Aydemir, Bilaloğlu (2004) установяват, че този хербицид увеличава единствено броят на геповете. Авторите представят резултатите в два варианта: 1) включват геповете към групата на хромозомните аберации и 2) изключват геповете към групата на хромозомните аберации. Този подход оказва влияние върху резултатите, тъй като само в първия вариант е установена статистически достоверна разлика с контролната група.

Анализът на структурата на метафазните хромозоми при провеждането на теста за хромозомни аберации обикновено се осъществява чрез наблюдение със светлинен микроскоп. Съвременните научно-изследователски методи и апаратура дават възможност да бъде анализирана ултраструктурата на хромозомите. Днес много изследвания на хромозомната структура се провеждат с помощта на АСМ (Liu *et al.* 2003; Tamayo 2003;

Tamiya *et al.*, 2003; Sugiyama *et al.* 2004; Wu *et al.*, 2006; Daban, 2011; Kalle, Strappe, 2012). Атомно-силовият микроскоп дава възможност да бъдат създавани изображения с висока резолюция (Thalhammer *et al.*, 2001), които осигуряват детайлна информация относно природата на хромозомните увреждания. Тази микроскопска техника е подходяща за провеждане и на количествен ултраструктурен анализ на различните видове хромозомни аберации (Фиг. 36). Според нас в специализираната научна литература няма данни за количествена оценка на кластоген-индуцирани хромозомни разкъсвания и гепове направена с помощта на АСМ. Такава оценка би допринесла за изясняване на спорния въпрос: Трябва ли геповете да бъдат включвани в общия брой хромозомни аберации?

Представените в точка V.4 на настоящата работа резултати от теста за хромозомни аберации в клетки от костен мозък на бели мишки са получени с помощта на СМ. Данните показват, че след третиране и с най-ниската доза (2.82×10^{-9} $\mu\text{g}/\text{kg}$) Вг-охрп проявява кластогенен ефект. Най-голям е броят на метафазните пластинки с разкъсвания от хроматиден тип. В някои от експерименталните групи е установен и увеличен процента на метафази с геп в хромозомите. Поради това, е проведен сравнителен анализ на наблюдаваните със светлинен микроскоп и на установените с атомно-силов микроскоп хромозомни аберации и гепове в метафазни хромозоми от бели мишки третирани с 2.82×10^{-9} $\mu\text{g}/\text{kg}$ Вг-охрп.



Фиг. 36. Триизмерно изображение на метафазна пластинка от костен мозък на бяла мишка. Сканираният район е $25 \times 25 \mu\text{m}$

В Таблица 13 са представени резултатите от проведения ултраструктурен анализ на наблюдаваните със СМ хромозоми с геп след третиране на бели мишки с Вг-охрп. Контролната група включва 1213 хромозоми, изолирани от костно-мозъчни клетки на бели мишки третирани с 0.9% NaCl. В тази група са установени 7 хромозоми с геп. Експерименталната група включва 1203 хромозоми, изолирани от костно-мозъчни клетки на бели мишки третирани с Вг-охрп. В тази група с помощта на СМ са установени 12

хромозоми с геп. Разликата между получените със СМ данни от експерименталната и от контролната група не е статистически значима. Топографският анализ на хромозомите с геп от контролната група показва, че в съответния район структурата на три от хромозомите е нарушена: в две от хромозомите този участък е декондензиран, а в третата хромозома има разкъсване, като разкъсаните краища са разположени много близо един до друг. Анализът на АСМ-изображенията на хромозомите с геп от експерименталната група показва, че в 3 от тях районът с геп е декондензиран участък (Фиг. 37), а в други 3 има разкъсване с близко лежащи краища.

Таблица 13.

Ултраструктурен анализ на наблюдаваните със СМ хромозоми с геп изолирани от костно-мозъчни клетки на бели мишки третирани с 2.82×10^{-9} $\mu\text{g}/\text{kg}$ Вг-охрh

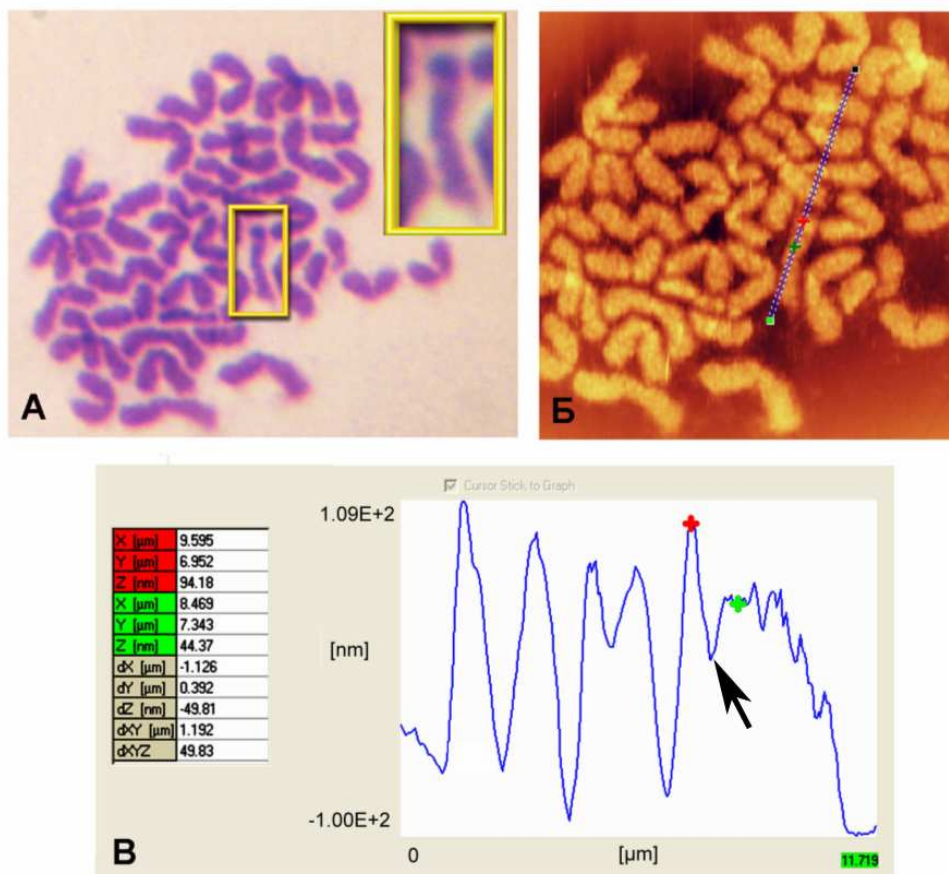
Проба	Анализирани хромозоми, брой	Гепове наблюдавани със СМ, брой	Отхвърлени с АСМ като:	
			Декондензиран район, брой (%)	Разкъсване, брой (%)
Контрола	1213	7	2 (28.6%)	1 (14.3%)
Вг-охрh	1203	12	3 (25.0%)	3 (25.0%)
Общо	2416	19	5 (26.3%)	4 (21.1%)

Контрола – 0.9% NaCl, * $P \leq 0.05$

Резултатите от нашето изследване показват, че около 50% от всички гепове, наблюдавани със СМ са същински гепове – увреждането е ахроматиново (структурата на хромозомата не е нарушена). Анализът на АСМ-изображенията на останалите 50% от хромозомите с геп показва, че наблюдаваните със СМ гепове представляват структурни изменения в хромозомите – участъците са разкъсани или декондензирани.

Клетките притежават редица механизми за мониторинг и поправка на структурата на хромозомите. Известно е, че хроматиновата релаксация е фундаментален механизъм в отговора на клетката на ДНК-увреждания (Heng *et al.*, 2004; Ziv *et al.*, 2006). Активирането на механизмите за поправка на ДНК и за преместването на ДНК-поправящите белтъци до местата на ДНК-увреждане се регулират от контролна точка в клетъчния цикъл наречена Увредена ДНК (Zhou, Elledge, 2000; Gross, 2008; Shi, Oberdoerffer, 2012). Съгласно тези схващания е възможно установените в нашето изследване декодензирани хромозомни райони да са възникнали в мястото на разкъсване като резултат от отговора на клетката на индуцирани от Вг-охрh ДНК-разкъсвания. Въз основа на тази хипотеза и на данните от проведения сравнителен анализ можем да направим извода, че геповете трябва да бъдат

включени в класификацията на видовете хромозомни аберации. Нашето заключение е в подкрепа на становището на Paz-y-Miño *et al.*, (2002), според които геповете представляват вид хромозомна аберация. Авторите установяват висока положителна корелация между данните от комет-тест и данните от тест за хромозомни аберации, само в случаите когато включват гепа в групата на хромозомните аберации.



Фиг. 37. Хромозома с мним геп. А – СМ-изображение на метафазна пластинка с хромозома с геп; Б – Двумерен АСМ-изображение на част от метафазна пластинка, включващ същата хромозома. Гепът се намира в района от хромозомата, заключен между червения и зеления плюс; В – Височинен профил на същата хромозома. Със стрелка е посочен декондензирания район, съответстващ на местоположението на гепа. Сканираният район е 25×25 μm

В настоящото изследване е проведенен и ултраструктурен анализ на наблюдаваните със СМ хромозоми с разкъсвания. Резултатите са представени в Таблица 14. Със СМ са установени 23 разкъсвания в хромозомите от експерименталната група и 8 разкъсвания в хромозомите от контролната група. Разликата между получените със СМ данни от контролната и експерименталната група е статистически значима. Анализът на създадените 3Д изображения на хромозомите от контролната група потвърди наличието на 7 разкъсвания. 3Д изображението на осмата хромозома показва, че съответния участък

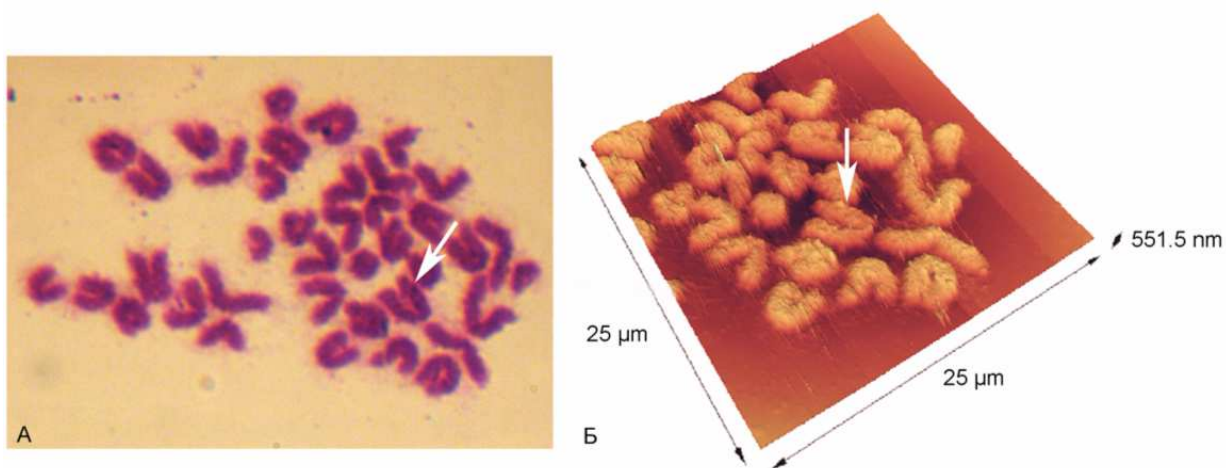
представява декондензиран район. При наблюдение със СМ в експерименталната група са установени 23 разкъсвания. Седемнадесет от тях са хроматиден тип разкъсвания, а 6 са хромозомен тип – разкъсвания и в двете хроматиди на три от хромозомите. Хромозомният тип разкъсвания не са изолокусни. Анализът на АСМ-изображенията показва, че 5 от наблюдаваните със СМ 23 разкъсвания би следвало да се класифицират като геп, защото целостта на съответния хромозомен участък не е нарушена (Фиг. 38). Други 3 разкъсвания са декондензирани райони.

Таблица 14.

Ултраструктурен анализ на наблюдаваните със СМ разкъсвания в метафазни хромозоми, изолирани от костен мозък на бели мишки третиран с 2.82×10^{-9} $\mu\text{g}/\text{kg}$ Вг-охрh

Проба	Анализирани хромозоми, брой	Разкъсвания наблюдавани със СМ, брой	Отхвърлени с АСМ като:	
			Декондензиран район, брой (%)	Геп, брой (%)
Контрола	1213	8	1 (12.5%)	-
Вг-охрh	1203	23*	3 (13.0%)	5 (21.7%)
Общо	2416	31	4 (12.9%)	5 (16.1%)

Контрола – 0.9% NaCl, *P \leq 0.05



Фиг. 38. Хромозома с АСМ-отхвърлено разкъсване. А – СМ-изображение на метафазна пластинка с хромозомно разкъсване. Със стрелка е посочено мястото на разкъсване; Б – Триизмерено изображение на част от пластинката, включваща същата хромозома. Със стрелка е посочено мястото, съответстващо на наблюдаваното със СМ хромозомно разкъсване. Областта на сканиране е $25 \times 25 \mu\text{m}$

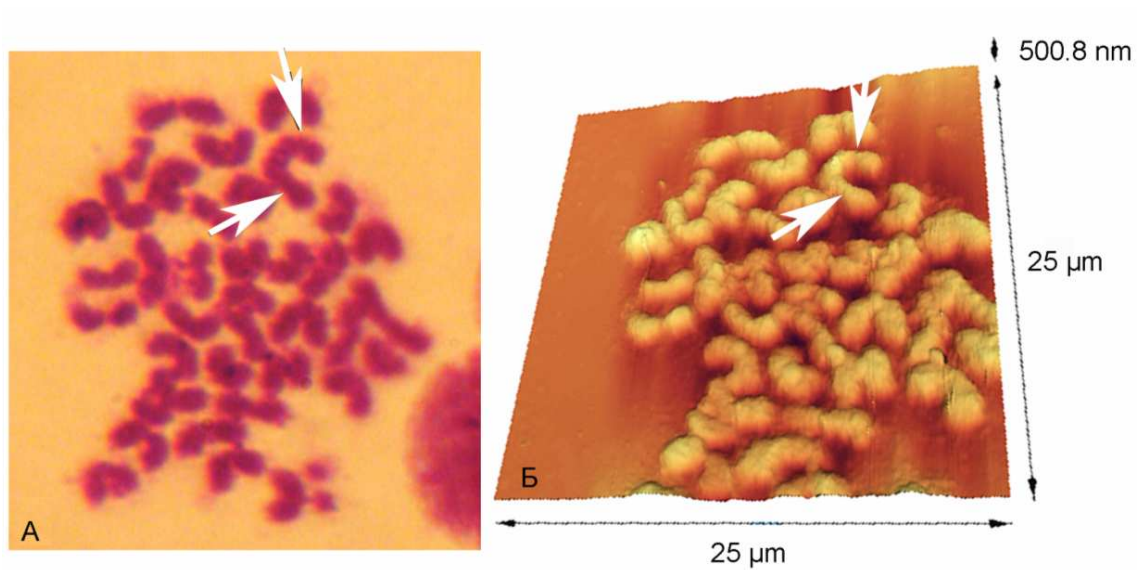
При СМ-анализа на хромозомите от експерименталната група са установени и малък брой аберации от типа слепване: три теломерни слепвания и две центромерни слепвания (Таблица 15) (Фиг. 39). Наблюдаван е и един необичаен вид аберация: центромерния район на една от хромозомите е свързан с рамото на друга хромозома (Фиг. 40). При анализа на триизмерните изображения на тези хромозоми не е потвърдено едно от наблюдаваните центромерни слепвания: топографското изображение ясно показва, че две големи акроцентрични хромозоми се застъпват в крайните участъци на рамената си (Фиг. 41). Това разположение на хромозомите при наблюдение със СМ води до категоричното, но неправилно заключение, че се наблюдава слепване на малка акроцентрична и голяма акроцентрична хромозома в центромерните райони. Не е потвърдено и едно от наблюдаваните със СМ теломерни слепвания. При анализа на 3Д изображенията е установено, че двете хромозоми са разположени много близо една до друга. При СМ-анализа на хромозомите от контролната група не е установено наличие на хромозомни слепвания.

Таблица 15.

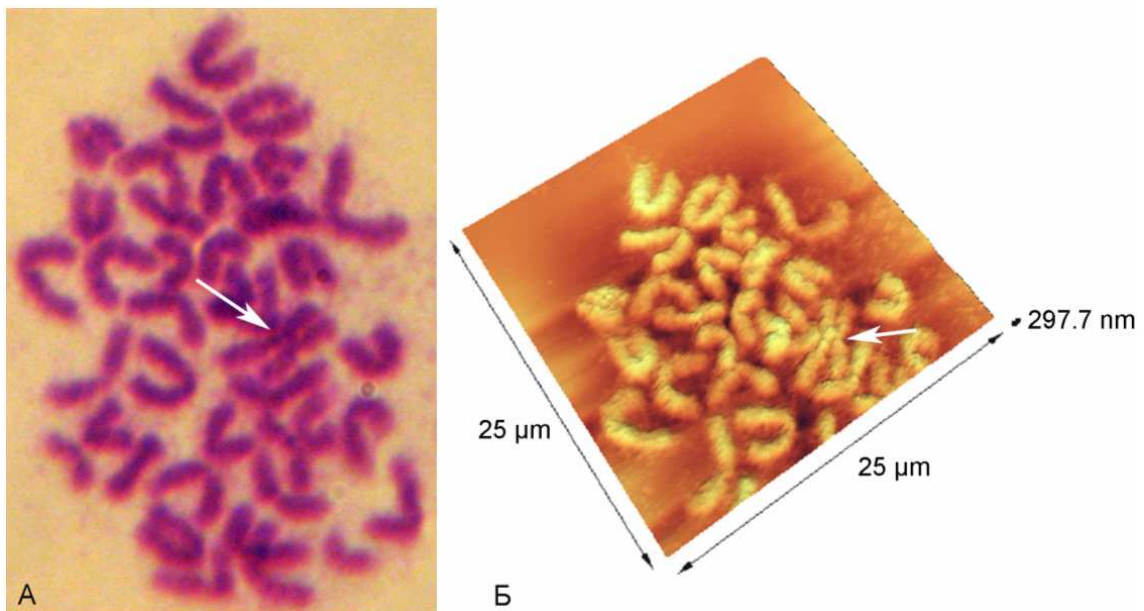
Ултраструктурен анализ на наблюдаваните със СМ слепвания на метафазни хромозоми, изолирани от костен мозък на бели мишки третиран с 2.82×10^{-9} $\mu\text{g}/\text{kg}$ Вг-охрh

Проба	Анализирани хромозоми, брой	Т/Т		Ц/Ц		Ц/ХР	
		Наблюдавани със СМ, брой	Отхвърлени с АСМ, брой (%)	Наблюдавани със СМ, брой	Отхвърлени с АСМ, брой (%)	Наблюдавани със СМ, брой	Отхвърлени с АСМ, брой
Контрола	1213	-	-	-	-	-	-
Вг-охрh	1203	3	1 (33.3%)	2	1 (50%)	1	-
Общо	2413	3	1 (33.3%)	2	1 (50%)	1	-

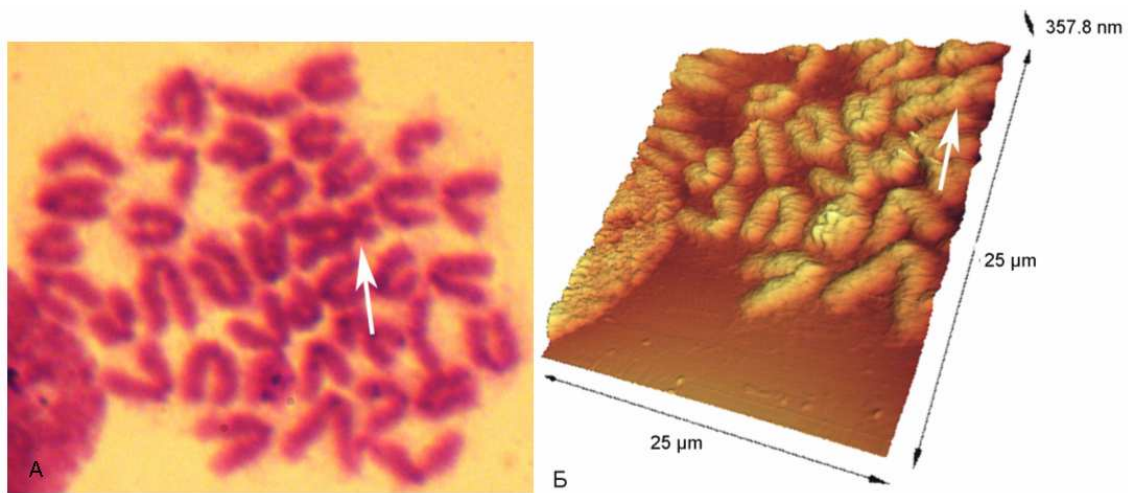
Контрола – 0.9% NaCl. Т/Т – слепване на хромозоми в теломерните райони, Ц/Ц – слепване на хромозоми в центромерните райони, Ц/ХР – слепване на центромерния район на хромозома с рамо на друга хромозома



Фиг. 39. Метафазна пластинка с теломерно слепване. А – СМ-изображение на метафазна пластинка с теломерно слепване. Със стрелки са посочени центромерните райони на двете хромозоми, слепени в теломерните си участъци; Б – Триизмерно изображение на част от пластинката, включваща същите хромозоми. Със стрелки са посочени центромерните райони на двете хромозоми, които са слепени в теломерните райони. Областта на сканиране е $25 \times 25 \mu\text{m}$



Фиг. 40. Метафазна пластинка със слепване между хромозомно рамо и центромера. А – СМ-изображение на метафазна пластинка с хромозомно слепване: центромерния район на едната хромозома е слепен с рамото на другата хромозома. Със стрелка е посочено мястото на слепване; Б – Триизмерно изображение на част от пластинката, включваща слепените хромозоми. Със стрелка е посочено мястото на слепване. Областта на сканиране е $25 \times 25 \mu\text{m}$



Фиг. 41. Хромозоми с АСМ-отхвърлено центромерно слепване. А – СМ-изображение на метафазна пластинка с центромерно слепване: слепване между малка акроцентрична и голяма акроцентрична хромозома в центромерните райони. Със стрелка са посочени двете слепени хромозоми; Б – Триизмерено изображение на част от пластинката, включващ същите хромозоми: две големи акроцентрични хромозоми се застъпват в крайните участъци на рамената. Областта на сканиране е 25×25 μm

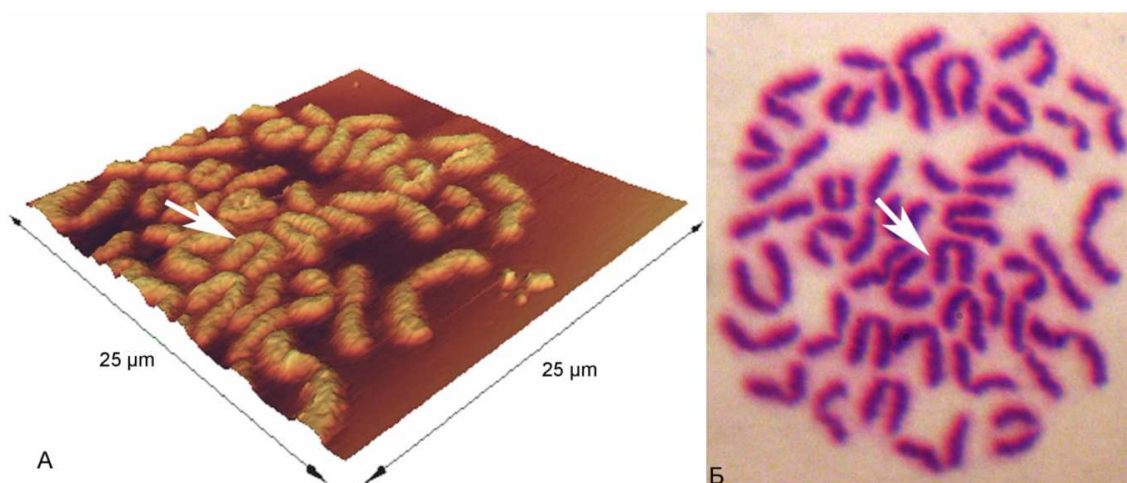
Както се вижда от Таблица 13, Таблица 14 и Таблица 15, при анализа на АСМ-изображенията някои от наблюдаваните със СМ аберации са потвърдени, а други са отхвърлени. При конвенционалия СМ-анализ на хромозомите от двете групи (контролна и експериментална група) са наблюдавани общо 31 разкъсвания, 19 гепа и 6 аберации от вида слепване. При АСМ анализа са отхвърлени 29.0% от разкъсванията, 47.4% от геповете и 33.0% от другите видове аберации. Топографският анализ на метафазните хромозоми показва и наличие на хромозомни аберации, които не са установени със СМ (Таблица 16). В контролната група са установени две разкъсвания, които не са наблюдавани със СМ. В експерименталната група са установени 8 ненаблюдавани със СМ хромозомни аберации. Четири от тях са разкъсвания (Фиг. 42), 3 са слепвания: двете са в теломерните райони, а третото е слепване на хромозомно рамо на една хромозома с центромерния район на друга хромозома. Анализът с АСМ показва наличие и на една пръстеновидна хромозома.

Таблица 16.

Ултраструктурен анализ на установените с АСМ и ненаблюдавани със СМ метафазни хромозоми с аберации, изолирани от костен мозък на бели мишки третирани с 2.82×10^{-9} $\mu\text{g}/\text{kg}$ Br-oxph

Проба	Анализирани хромозоми (брой)	Разкъсвания (брой)	Пръстеневидни хромозоми (брой)	Слепване:			Общо
				Т/Т (брой)	Ц/Ц (брой)	Ц/ХР (брой)	
Контрола	1213	2	0	0	0	0	2
Br-oxph	1203	4	1	2	0	1	8

Контрола: 0.9% NaCl, Т/Т – слепване на хромозоми в теломерните райони, Ц/Ц – слепване на хромозоми в центромерните райони, Ц/ХР – слепване на центромерния район на хромозома с рамото на друга хромозома



Фиг. 42. Метафазна пластинка с хромозома с разкъсване. А – Триизмерено изображение на част от метафазна пластинка, в която едната хромозома е с разкъсване. Със стрелка е посочено мястото на разкъсване; Б – СМ-изображение на същата метафазна пластинка: не се наблюдават хромозомни аберации. Със стрелка е посочено мястото в хромозомата, съответстващо на установеното с АСМ разкъсване. Областта на сканиране е $25 \times 25 \mu\text{m}$

След анализа на създадените в настоящето изследване три-измерни изображения на хромозомите от контролната и експерименталната група значително е коригиран броя на различните видове хромозомни аберации наблюдавани със СМ. От друга страна, е установено наличие на хромозомни аберации, които не са наблюдавани с светлинен микроскоп. В Таблица 17 са представени данните относно броя на аберациите, наблюдавани само със СМ и броя на аберациите, установени само с АСМ. При ОМ-анализа на метафазните хромозоми

са наблюдавани 15 аберации в контролната група и 41 в експерименталната. Разликата между данните от двете групи е статистически значима. При анализът на топографските изображения на хромозомите са установени 14 аберации в хромозомите от контролната и 41 в хромозомите от експерименталната група. Разликата между данните от двете групи е статистически значима ($P \leq 0.05$). Както се вижда от Таблица 17, разликите в общия брой хромозомни аберации, установени с използването на двете микроскопски техники са минимални: честотата на хромозомните аберации в експерименталната група е почти 3 пъти повече от този в контролната група. Данните от АСМ-анализа потвърждават данните от СМ-анализа, че в доза 2.82×10^{-9} $\mu\text{g}/\text{kg}$ Вг-охрh има генотоксично действие върху хромозомно-мозъчни клетки на бели мишки и че това влияние е резултат основно от неговата кластогенна активност – разкъсванията са 71% от всички видове аберации.

Таблица 17.

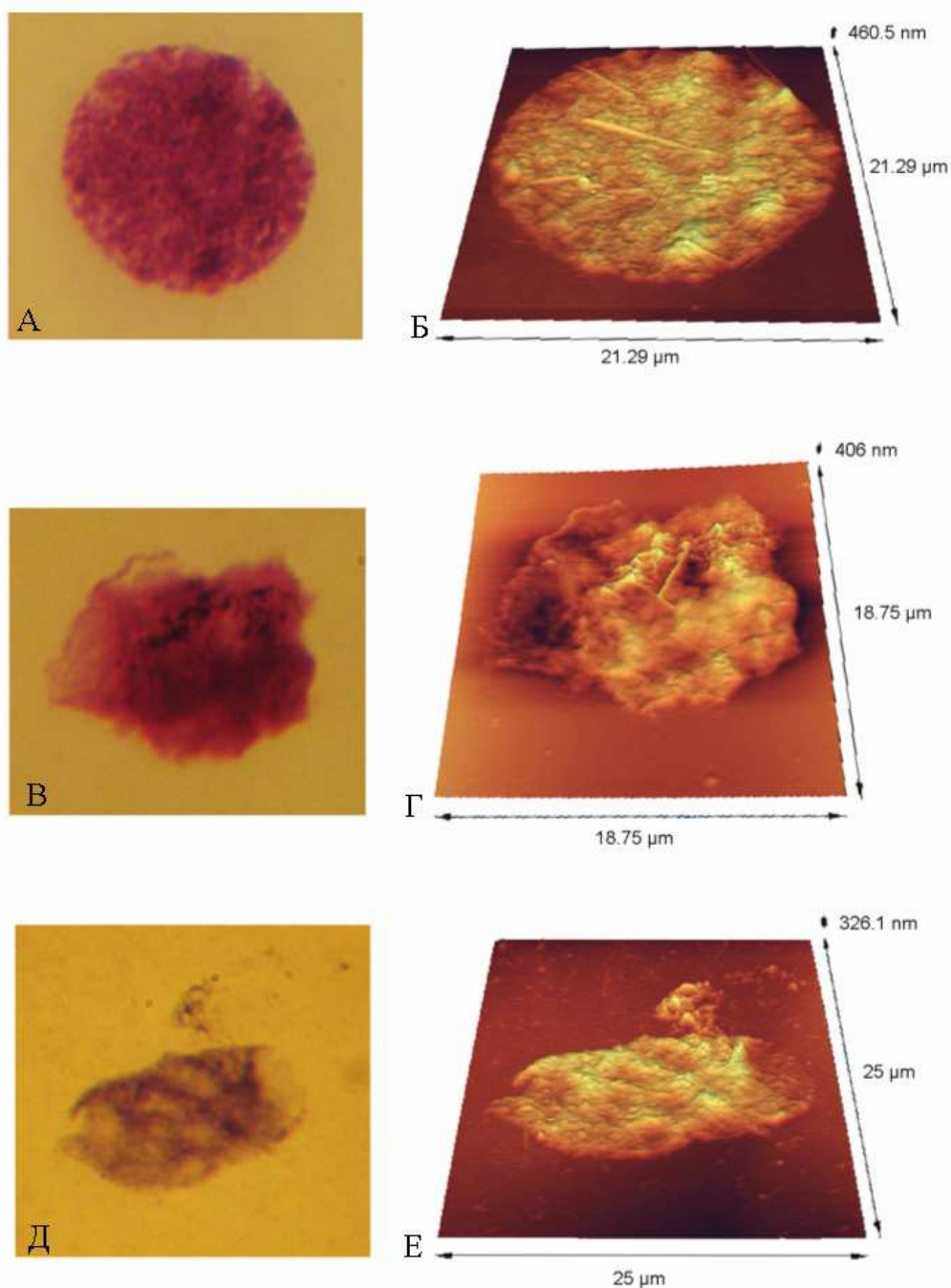
Сравнителен анализ на наблюдаваните със СМ и на установените с АСМ аберации в метафазни хромозоми, изолирани от костен мозък на бели мишки третиран с 2.82×10^{-9} $\mu\text{g}/\text{kg}$ Вг-охрh

Проба	Анализирани хромозоми (брой)	СМ				АСМ			
		Разкъсвания (брой)	Гепове (брой)	Слепвания и пръстеновидни хромозоми (брой)	Общ брой, (%)	Разкъсвания (брой)	Гепове (брой)	Слепвания и пръстеновидни хромозоми (брой)	Общ брой, (%)
Контрола	1213	8	7	0	15 (1.24%)	10	4	0	14 (1.15%)
Вг-охрh	1203	23	12	6	41* (3.41%)	22	11	8	41* (3.41%)

Контрола – 0.9% NaCl, * $P \leq 0.05$

При светлинно-микроскопският анализ е установено, че някои от изолираните костно-мозъчни ядра в експерименталната група са фрагментирани и кондензирани. Триизмерните изображения на тези ядра потвърждават наблюдаваните със СМ морфологични изменения (Фиг. 43). Тези изменения са характерни за ядра на клетки претърпели апоптоза (Kam, Ferch, 2000; Gorneva *et al.*, 2005; Pelzel *et al.*, 2010). Апоптозата е генетично програмирана клетъчна смърт (Драгоева, 2006; Hausmann, 2010) и защитен механизъм, чрез който организма оцелява когато ДНК-уврежданията не са поправени

(Grishin *et al.*, 2001; Rastogi *et al.*, 2009). Контролната точка Увредена ДНК регулира и процеса апоптоза. Въпреки че теста за хромозомни аберации не е предназначен за оценка на способността на дадено химично съединение да индуцира апоптоза, установените от нас морфологични изменения са още един индикатор за генотоксично и цитотоксично действие на Br-oxph.



Фиг. 43. Ядра, изолирани от костно-мозъчни клетки на бели мишки инжектирани с 2.82×10^{-9} µг/кг Br-oxph. А и Б – 2Д и 3Д изображение на клетъчно ядро с нормална морфология; В и Г – 2Д и 3Д изображение на кондензирано клетъчно ядро; Д и Е – 2Д и 3Д изображение на фрагментирано клетъчно ядро

Проведеният сравнителен анализ позволява да се направят следните заключения:

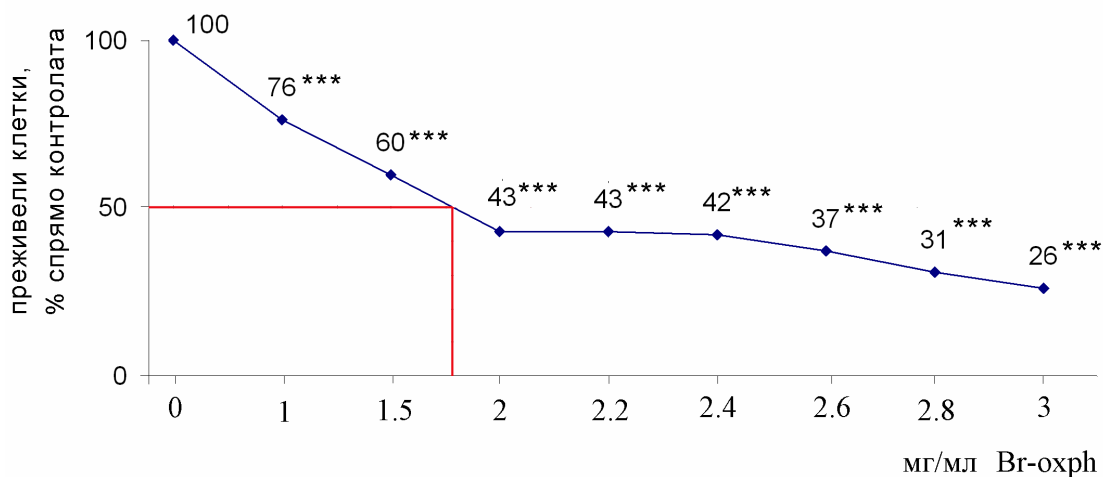
- ✓ геповете би следвало да се включват в групата на хромозомните аберации;
- ✓ установената със СМ генотоксична активност на Вг-охрh в ниска доза е доказана с ултраструктурен анализ на топографията на метафазните хромозоми;
- ✓ доказана е валидността на провеждания с помощта на СМ тест за хромозомни аберации в клетки от костен мозък при изследване генотоксичността на химични съединения.

5. Определяне на цитотоксичната и апоптотична активност на Вг-охрh върху туморни клетки

Апоптозата е важен процес в нормалното развитие и в хомеостазата на тъканите, и ключов механизъм в цитотоксичното действие на противотуморните лекарства (Vacsó *et al.*, 2000). Основните характеристики на програмираната клетъчна смърт са свиване на клетката, формиране на апоптотични телца, кондензация на хроматина и разкъсване на ДНК до фрагменти с различна дължина. Резултатите получени от теста за хромозомни аберации в клетки от костен мозък на бели мишки показват, че Вг-охрh индуцира двойноверижни ДНК разкъсвания, както и наличие на фрагментирани и кондензирани ядра (Фиг. 43). Тези данни показват необходимостта от изследване на потенциала на Вг-охрh да индуцира апоптоза.

При установяване на апоптотичния потенциал на химичните съединения първоначално се провежда тест за определяне на влиянието им върху виталността и пролиферативната активност на клетките от съответните клетъчни линии в *in vitro* условия. Аналогично на *in vivo* теста за токсичност въз основа на растежа на корен от семена на културно растение, целта на теста за пролиферативна активност е да се установи *in vitro* цитотоксичното действие на изследваното химично съединение върху клетки от избрани клетъчни линии и да се определи стойността на средната инхибираща концентрация (IC50).

В настоящото изследване беше проведен тест с WST-1 (тетразолиева сол) за оценка на влиянието на Вг-охрh върху виталността и пролиферативната активност на белодробни туморни клетки от клетъчната линия SK-MES-1. Изследвани бяха 8 концентрации в диапазона от 1 мг/мл до 3 мг/мл, като времето на въздействие беше 48 ч.

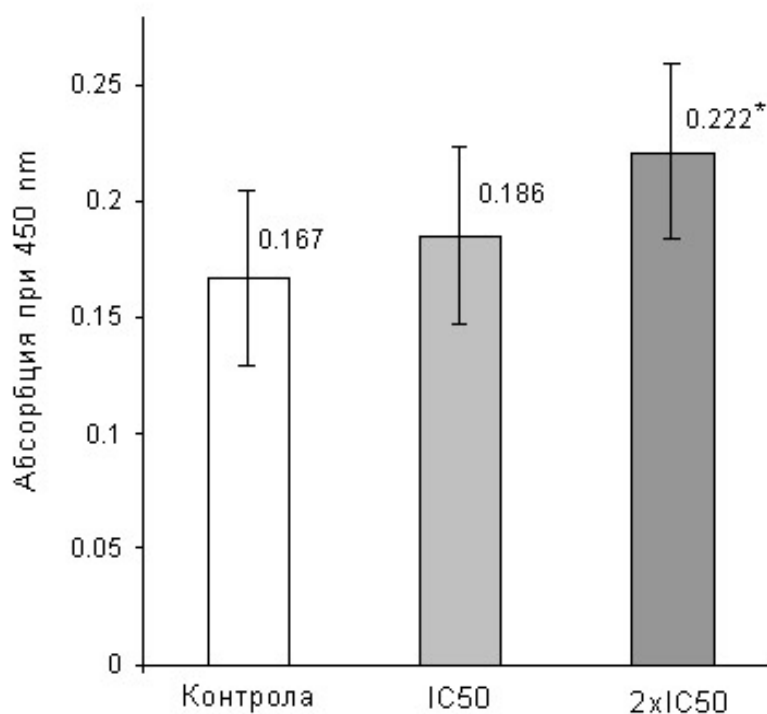


Фиг. 44. Влияние на Vg-oxph върху преживяемостта и пролиферативната активност на белодробни туморни клетки от клетъчната линия SK-MES-1. *** $P \leq 0.001$

Както се вижда от представените данни, процентът на жизнеспособните клетки след въздействие с 1 мг/мл Vg-oxph спрямо жизнеспособните клетки от контролната група е 76%, а след въздействие с 1.5 мг/мл – съответно 60% (Фиг. 44). Инхибиращото действие на Vg-oxph в диапазона от 2 мг/мл до 2.4 мг/мл е сравнително еднакво: жизнеспособните клетки са 42 – 43% спрямо контролната група. Тази закономерност – намаляване на процента преживели клетки с увеличаване на концентрацията, се наблюдава и при най-високите концентрации: след въздействие с 3 мг/мл Vg-oxph само 26% от клетките са оцелели. Наблюдаваните разлики са статистически достоверни ($P \leq 0.001$). Анализът на резултатите показва, че в избрания диапазон от концентрации Vg-oxph инхибира виталността и пролиферативната активност на клетките от клетъчната линия SK-MES-1. Това влияние нараства с увеличаване на концентрацията. С помощта на графиката, отразяваща зависимостта между концентрацията на Vg-oxph и процента на преживели клетки, беше определена стойността на концентрацията, при която се наблюдава 50%^{no} инхибиране на клетъчната виталност и пролиферативна активност: IC50 е 1.8 мг/мл.

Процесът програмираната клетъчна смърт започва, когато резултатът от поправката на ДНК не е задоволителен и нивата на ДВР-ДНК са високи (Halazonetis *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2009; Shi, Oberdoerffer, 2012). При апоптоза ДНК-фрагментите преминават от ядрото в цитоплазмата на клетката като комплекс ДНК-хистони (Au, Wientjes, 1999). Някои автори показват, че ранните етапи на апоптоза могат да бъдат установени 1-3 часа от началото на третиране (Bacsó *et al.*, 2000; Krüger *et al.*, 2009; Gibbons *et al.*, 2012). Поради това, апоптотичната активност на Vg-oxph беше изследван посредством Cellular DNA Fragmentation ELISA kit. Белодробни туморни клетки бяха третирани в продължение на 3 часа с Vg-oxph. Изследваните концентрации бяха IC50 (1.8 мг/мл) и 2xIC50 (3.6 мг/мл).

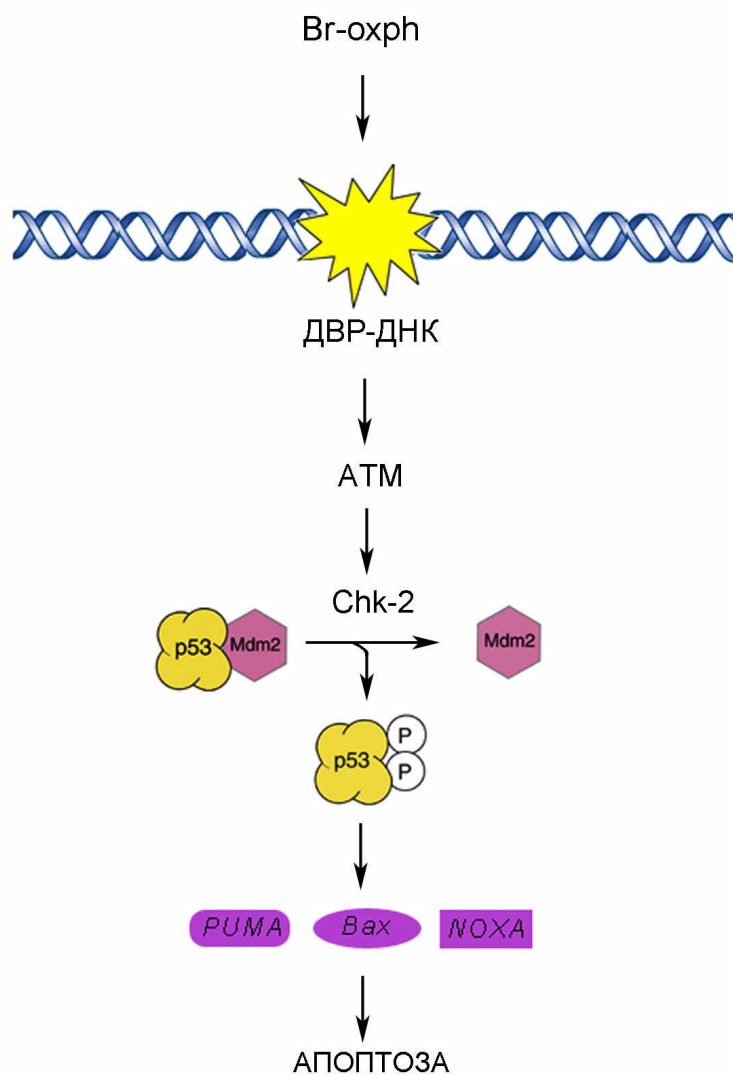
На Фиг. 45 са представени данните относно потенциала на Vg-oxph да индуцира апоптоза в белодробни туморни клетки от клетъчна линия SK-MES-1. И при двете изследвани концентрации е установено нарастване на количеството ДНК-фрагменти в цитоплазмата на клетките. Цитоплазмените ДНК-фрагменти в клетки, третирани с изследвания оксафосфол в концентрация 1.8 мг/мл (IC50) са с 11% повече в сравнение с тези в контролните клетки. Разликата не е статистически достоверна. ДНК-фрагментите изолирани от клетки третирани с концентрация 2xIC50 са с 33% повече от тези в контролните клетки. Разликата е статистически достоверна ($P \leq 0.05$). Тези данни показват, че изследваното съединение индуцира апоптоза в клетки от клетъчната линия SK-MES-1. Тези резултати са в съответствие с установената от нас кластогенна активност на Vg-oxph спрямо костно-мозъчни клетки от бели мишки след 3 часов период на третиране.



Фиг. 45. Апоптотична активност на Vg-oxph спрямо белодробни туморни клетки от клетъчната линия SK-MES-1, изразена чрез абсорбцията на цитоплазмените ДНК-фрагменти. * $P \leq 0.05$

В зависимост от степента и вида на ДНК-уврежданията отговорът на клетката е 1) блокиране на клетъчния цикъл и поправка на ДНК и/или 2) апоптоза. Транскрипционният фактор p53 е ключов елемент и в двата механизма на клетъчния отговор (Hosako *et al.*, 2007; Ozaki, Nakagawara, 2011; Reinhardt, Schumacher, 2012). Установените от нас апоптотична и кластогенна активност на Vg-oxph ни дават основание да предположим, че вероятно съединението индуцира апоптоза чрез механизъм, включващ p53 и киназата ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) (Фиг. 46). Когато процесът на поправка на ДНК не е успешен, про-

апоптотичната активност на гена p53 се активира с посредничеството на ATM: ATM фосфорилира киназата Chk-2 (Checkpoint proteins), която фосфорилира белтъка p53 (Bolderson *et al.*, 2009; Ozaki, Nakagawara, 2011; Roos, Kaina, 2012). Това разрушава връзката p53–Mdm2, количеството на транскрипционния фактор се увеличава, което му позволява да активира експресията на апоптотични гени като *PUMA*, *NOXA*, и *Bax* (Ozaki, Nakagawara, 2011; Song *et al.*, 2011; Reinhardt, Schumacher, 2012).



Фиг. 46. Схема на вероятния механизъм на индуциране на апоптоза след въздействие с Br-oxph

Въпреки че активните съставки на много от селскостопанските препарати са органофосфорни съединения, резултатите от *in vivo* изследванията относно биологичната активност на Br-oxph показват, че вероятно употребата на Br-oxph върху обширни площи крие риск за околната среда и за здравето на човека. От друга страна, данните от *in vitro* изследванията относно биологичната активност на Br-oxph показват, че съединението има антипролиферативен ефект върху белодробни туморни клетки и индуцира апоптоза в

клетки от изследваната клетъчна линия. Повечето химиотерапевтични лекарства са генотоксични (Turinetta *et al.*, 2009), а тяхната ефективност се дължи на инхибирането на клетъчната пролиферация и/или индуцирането на апоптоза в туморните клетки (Jessen *et al.*, 2005; Shenoy *et al.*, 2007; Rastogi *et al.*, 2009). Резултатите от нашето изследване ни дават основание да очакваме, че вероятно изследваният от нас оксафосфол притежава антитуморна активност и би могъл да намери приложение в борбата с някои туморни заболявания при човека. Много от химиотерапевтичните лекарства имат слаба селективност и могат да увредят нормалните клетки, което ограничава тяхната клинична ефективност (Jessen *et al.*, 2005). Поради това настоящите ни изследвания са насочени към установяване на антипролиферативната и апоптотична активност на Вг-охрh върху нормални клетки и туморни клетки от други клетъчни линии. Първите резултати показват, че след въздействие с 2 мг/мл жизнеспособните чернодробни туморни клетки (SK-HEP-1) са 7% спрямо контролната група (даните не са представени). Това ни дава основание да очакваме, че Вг-охрh притежава селективно цитотоксично и апоптотично действие върху различните видове туморни клетки.

В заключение можем да обобщим, че Вг-охрh притежава цитотоксична и апоптотична активност спрямо белодробни туморни клетки от клетъчната линия SK-MES-1.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Органофосфорните съединения проявяват разнообразна биологична активност и намират приложение в различни области. Нашето изследване е насочено към проучване на генотоксичната и цитотоксична активност на оргонофосфорно съединение от групата на оксафосфолите (Br-oxph). Изследванията представляват особен интерес, тъй като показват някои възможности за практическо приложение на това съединение и позволяват да се направи оценка на риска за човешкото здраве и за опазването на околната

Br-oxph проявява генотоксично и цитотоксично влияние върху митотични клетки от еукариотни тест-обекти. Това влияние се характеризира със специфичност в зависимост от тест-обекта и от периода на третиране. При въздействие в продължение на 24 ч. и 48 ч. в концентрация $\frac{1}{2}$ EC50 (10^{-3} М) Br-oxph проявява ясно изразен генотоксичен и цитотоксичен ефект спрямо меристемните клетки на корени от *Allium cepa* L. Три часовото въздействие с Br-oxph не повлиява съществено темпа на клетъчна пролиферация, но процентът на аномалните митотични клетките във всички експериментални групи е висок. Два клетъчни цикъла не са достатъчни за възстановяване на клетките на *Allium cepa* L. след 3 часовия период на третиране с Br-oxph. Генотоксичното и цитотоксично действие на изследвания оксафосфол е ясно изразено 24 ч. и 48 ч. след краткосрочното третиране. Това вероятно е резултат от действието на молекули Br-oxph, акумулирани в кореновата меристема през 3 часовия период на третиране. Най-често срещаните нарушения са свързани с целостта на хромозомите (формиране на хромозомен мост с или без фрагменти през анафаза и телофаза).

Три часа след еднократно третиране с Br-oxph се наблюдава незначително инхибиране на темпа на клетъчна пролиферация на костно-мозъчните клетки от бели мишки. Този ефект е ясно изразен на 24^{-тия} и 48^{-мия} час. Br-oxph има кластогенно влияние върху митотични клетки на животинския тест-обект, за разлика от влиянието му върху растителния тест-обект.

Характерна особеност в биологичната активност на Br-oxph е ясно изразеното генотоксично влияние в най-ниските изследвани концентрации/доза. Кластогенният ефект на Br-oxph в най-ниската доза от 2.82×10^{-9} $\mu\text{g}/\text{kg}$ е доказан и чрез ултраструктурен анализ на топографията на метафазните хромозоми. АСМ-анализът показва също така, че геповете би следвало да се включват в групата на хромозомните аберации, тъй като 50% от тях представляват структурни изменения в хромозомите. Анализът на АСМ-изображенията на метафазните хромозоми доведе също така до значително коригиране на броя на различните видове хромозоми аберации, наблюдавани със СМ. Някои от наблюдаваните със СМ аберации бяха потвърдени, а други – отхвърлени. От друга страна, топографският анализ показва и наличие на хромозомни аберации, които не могат да бъдат установени със СМ. Въпреки това, разликите в общия брой хромозомни аберации, установени с помощта на

двете микроскопски техники са минимални, което доказва валидността на провеждания с помощта на СМ тест за хромозомни аберации в клетки от костен мозък при изследване генотоксичността на химични съединения.

Vr-oxph проявява генотоксично и цитотоксично действие и върху човешки туморни клетки в *in vitro* условия. Съединението инхибира виталността и пролиферативната активност на белодробни клетки от клетъчната линия SK-MES-1, като процентът на жизнеспособните клетки намалява с увеличаване на концентрацията. Инхибиращото влияние се дължи на индуцирането на апоптоза в тези клетки. Установената апоптотична (*in vitro*) и кластогенна активност (*in vivo*) на Vr-oxph показват, че механизъмът на апоптоза вероятно включва транскрипционния фактор p53 и киназата ATM.

Активните съставки на много от селскостопанските препарати са органофосфорни съединения. Резултатите от *in vivo* изследванията на Vr-oxph показват, че вероятно употребата на Vr-oxph върху обширни площи крие риск за околната среда и за здравето на човека. От друга страна, данните от *in vitro* изследванията показват, че изследвания от нас оксафосфол би могъл да намери приложение в борбата с някои туморни заболявания при човека.

VII. ИЗВОДИ

Получените резултати относно генотоксичното и цитотоксично влияние на *4-bromo-N,N-diethyl-5,5-dimethyl-2,5-dihydro-1,2-oxaphosphol-2-amine 2-oxide* върху митотични клетки, позволяват да се направят следните изводи:

1. Третирането в продължение на 24 ч. и 48 ч. с Вг-охрп (10^{-3} М) оказва генотоксичен и цитотоксичен ефект върху меристемни клетки от корен на *Allium cepa* L.
2. Третирането в продължение на 3 ч. с Вг-охрп (10^{-3} М, 10^{-6} М и 10^{-9} М) има генотоксичен ефект върху меристемни клетки от корен на *Allium cepa* L., но незначително повлиява тяхната пролиферативна активност.
3. Период на възстановяване с продължителност от 24 ч. и 48 ч. не е достатъчен, за да се възстановят меристемните клетки от корен на *Allium cepa* L. след краткосрочното третиране (3 ч.) с Вг-охрп (10^{-3} М, 10^{-6} М и 10^{-9} М).
4. Третирането с Вг-охрп индуцира в митотичните клетки на *Allium cepa* L. увреждания свързани основно с делителния апарат на клетките.
5. Еднократното третиране с Вг-охрп оказва кластогенен и цитотоксичен ефект върху клетки от костен мозък на бели лабораторни мишки.
6. Кластогенната ативност на Вг-охрп в ниска доза (2.82×10^{-9} $\mu\text{g}/\text{kg}$) е потвърдена чрез ултраструктурен анализ на метафазни хромозоми от костен мозък на бели лабораторни мишки.
7. АСМ-анализът показва, че геповете в метафазните хромозоми би следвало да бъдат включвани в групата на хромозомните аберации.
8. Валидността на провеждания с помощта на СМ тест за хромозомни аберации в клетки от костен мозък на бели мишки третиран с Вг-охрп (2.82×10^{-9} $\mu\text{g}/\text{kg}$) е потвърдена чрез ултраструктурен анализ.
9. Вг-охрп оказва цитотоксичен ефект върху белодробни туморни клетки от клетъчна линия SK-MES-1.
10. Третирането с Вг-охрп (IC_{50} и $2 \times \text{IC}_{50}$) в продължение на 3 ч. индуцира апоптоза в белодробни туморни клетки от клетъчна линия SK-MES-1.

VIII. ПРИНОСИ

С фундаментален характер:

1. За пръв път е приложен комплексен подход в изследване относно биологичната активност на съединение от групата на хетероциклените оксафосфоли (Br-oxph), като е приложен модел, включващ няколко метода и тест-обекта в *in vivo* и *in vitro* изследвания.
2. Доказано е генотоксичното и цитотоксично влияние на съединение от групата на хетероциклените оксафосфоли (Br-oxph) *in vivo* върху растителен и животински тест-обекти.
3. Доказана е *in vitro* апоптотичната активност на съединение от групата на хетероциклените оксафосфоли върху туморни клетки.

С научно-приложен характер:

1. Доказана е валидността на рутинно провеждания със СМ тест за хромозомни аберации.

IX. ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Периодични научни списания:

1. **Kalcheva, V., A. Dragoeva, K. Kalchev, D. Enchev** (2009) Cytotoxic and genotoxic effects of Br-containing oxaphosphole on *Allium cepa* L. root tip cells and mouse bone marrow cells. *Genetics and Molecular Biology*. 32(2):389-393. (IF 0.58 за 2009 г.)
2. **Kalcheva, V.P., A.P. Dragoeva, K.N. Kalchev, D.D. Enchev** (2009) Low dose genotoxicity of 4-bromo-N,N-diethyl-5,5-dimethyl-2,5-dihydro-1,2-oxaphosphol-2-amine 2-oxide in mice bone marrow cells and *Allium cepa* L. root tip cells. *GENETIKA*. 41(2):179-188.
3. **Kalcheva V., A. Dragoeva, K. Kalchev, D. Enchev** (2009) Determination of cytotoxic effect of 4-bromo-N,N-diethyl-5,5-dimethyl-2,5-dihydro-1,2-oxaphosphol-2-amine 2-oxide. *Biotechnol. & biotechnol. eq., special edition/on-line*. 23(2):414-417 (XI Anniversary scientific conference with international attenddnce, 27-29.05.2009, Sofia). ((IF 0.5 за 2009 г.)
4. **Колева, В.** (2011) Генотоксичност и цитотоксичност на 4-bromo-N,N-diethyl-5,5-dimethyl-2,5-dihydro-1,2-oxaphosphol-2-amine 2-oxide в концентрация 10^{-3} М върху меристемни клетки от корен на *Allium cepa* L. след 24 часа и 48 часа въздействие. *Science & Technologies*. 1(3):82-87 (Двадесет и първа международна научна конференция, Стара Загора. 2-3 юни 2011).

Участие в научни форуми:

1. **Kalcheva V., A. Dragoeva, K. Kalchev, D. Enchev** (2009) Low dose genotoxicity of 4-bromo-N,N-diethyl-5,5-dimethyl-2,5-dihydro-1,2-oxaphosphol-2-amine 2-oxide in mice bone marrow cells, IV congress of the Serbian genetic society, Tara, 1-5.06.2009, p.55.

Забелязани цитирания:

Kalcheva V., A. Dragoeva, K. Kalchev, D. Enchev (2009) Cytotoxic and genotoxic effects of Br-containing oxaphosphole on *Allium cepa* L. root tip cells and mouse bone marrow cells. *Genetics and Molecular Biology*. 32(2): 389-393. (IF 0.58):

1. De Micco, V., C. Arena, D. Pignalosa, M Durante. (2011) Effects of sparsely and densely ionizing radiation on plants. *Radiation and Environmental Biophysics*. 50(1):1-19. (IF 1.696)
2. Машковић Павле, дипломирани хемичар, је за израду докторске дисертације пријавио тему, Биохемијска активност алкохолног екстракта биљака *Halacsysa sendtneri*, *Onosma aucherianum* и *Kitaibelia vitifolia* у функцији количине фенолних једињења. 2011 Научно-наставном већу ПМФ-а у Крагујевцу (дисертација)
3. Pavle Mašković, Jelena Dragišić Maksimović, Vuk Maksimović, Jelena Blagojević, Mladen Vujošević, Nedeljko T. Manojlović, Marija Radojković, Milica Cvijović and Slavica Solujić. 2012. Biological activities of phenolic compounds and ethanolic extract of *Halacsysa sendtneri* (Boiss) Dörfler. *Central European Journal of Biology*. 7(2): 327-333. (IF 1.0)
4. Abdel-Hameid, N.R., M.A.M. Elanany, A.A.A. Haiba, E.A.A. AbdEl-Hady (2011) Relative Mutagenecity of Some Food Preservatives on Plant Cells. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 5(12): 2817-2826.
5. Marija Radojković, Ekstrakti duda (*Morus* spp., *Morasceae*), sastav, delovanje i primena, doktorska disertacija, UNIVERZITET U NOVOM SADU, TEHNOLOŠKI FAKULTET, 2012 (дисертација)

Kalcheva, V.P., A.P. Dragoeva, K.N. Kalchev, D.D. Enchev (2009) Low dose genotoxicity of 4-bromo-N,N-diethyl-5,5-dimethyl-2,5-dihydro-1,2-oxaphosphol-2-amine 2-oxide in mice bone marrow cells and Allium cepa L. root tip cells. GENETIKA. 41(2):179-188.

1. Qu, Z., X. Chen, J. Yuan, Y. Bai, T. Chen, L. Qu, F. Wang, X. Li, Y. Zhao (2012) New synthetic methodology leading to a series of novel heterocyclic α -aminophosphonates: a very attractive expansion of Kabachnik-Fields reaction. *Tetrahedron*. 68(15):3156-3159. (IF 3.06)

Изказвам най-искрени благодарности на моите научни консултанти проф. д-р Севдалин Георгиев и доц. д-р Мариела Оджакова за получените знания, умения и опит, както и за неоценимата подкрепа, които ми оказва при разработването и оформянето на дисертационния труд!

Сърдечно благодаря на проф. д-р Добромир Енчев и доц. д-р Ася Драгоева, с чиято помощ, съвети и подкрепа е свързано не само разработването на настоящата дисертация, но и цялостното ми израстване като преподавател и научен работник!

Изказвам най-дълбока благодарност на доц. д-р Марина Бурова и д-р Андреана Андреева за възможността за работа с атомно-силовия микроскоп!

Искрено благодаря на всички колеги от катедра Биохимия при Биологически факултет на СУ "Св. Климент Охридски" и от Факултета по природни науки на ШУ "Епископ Константин Преславски" за съветите и неоценимата помощ при разработването на настоящата дисертация!