

## ЦИТОТОКСИЧНОСТ НА ФУНГИЦИДА МАНКОЦЕБ *IN VITRO*

Ани Георгиева, Антон Крил, Иван Иванов

Манкоцеб, полимерен комплекс на манганов етилен-1,2-бис (дитио-карбамат) с цинкова сол, е широко използван фунгицид. В настоящото изследване, цитотоксичният потенциал на фунгицида манкоцеб беше изследван при първични култури от ембрионални клетки на сирийски златен хамстер (SHE клетки) и при постоянната клетъчна линия от миши ембрионални фибробласти BALB/c 3T3. Цитотоксичността беше изследвана чрез теста за поглъщане на багрилото неутрално червено (Neutral Red Uptake). Чувствителността на клетките към изпитваното химично съединение беше определена от IC<sub>50</sub> стойностите. Налюдаван беше ясно изразен дозозависим цитотоксичен ефект при двете клетъчно културални системи след 24-часово третиране с манкоцеб. Установено е, че SHE клетъчните култури са по-чувствителни към цитотоксичния ефект на манкоцеб, в сравнение с BALB/c 3T3 културите. Данните, получени от нашите експерименти, показват, че SHE клетките и BALB/c 3T3 клетъчната линия са полезни модели за изследване на цитотоксичния потенциал на дитиокарбаматните фунгициди.

Ключови думи: цитотоксичност, клетъчни култури, фунгицид, манкоцеб

IN OVO ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЕМБРИОТОКСНИЯ, МУТАГЕННИЯ И  
КАНЦЕРОГЕННИЯ ПОТЕНЦИАЛ НА ЕТИЛЕН БИСДИТИОКАРБАМАТНИЯ  
ФУНГИЦИД МАНКОЦЕБ

Ани Георгиева, Антон Крил, Иван Иванов

Манкоцеб, етилен бисдитиокарбамат е един от най-често използваните фунгициди през последните десетилетия. Ембриотоксичният, мутагенният и канцерогенният потенциал на манкоцеб бяха изследвани при ембриони от кокошки Бял легхорн, линия 151. Тестът за канцерогенност *in ovo* (ЮСА) беше използван, за да се определи способността на манкоцеб да предизвиква токсичност и впоследствие морфологични промени в ембрионалния черен дроб, в сравнение с канцерогена N-нитрозодиметиламин (NDMA). В това проучване, NDMA индуцира фокуси от променени хепатоцити, образуване на тубуларни структури и хиперплазия на холангиоцити. Хистологичното изследване на ембриони, третирани с манкоцеб, разкрива тежко токсично увреждане на чернодробната тъкан. Третирането на птичи ембриони с дози на манкоцеб, предизвикващи висока смъртност води до появата на базофилни фокуси, наподобяващи тези, наблюдавани при третираните с NDMA ембриони. Мутагенният потенциал на манкоцеб е оценен чрез *in ovo* тест за формиране на микроядра (HET-MN). Прилагането на този фунгицид не предизвиква значително увеличаване на честотата на еритроцитите с микроядра, за разлика от добре познатия мутаген NDMA.

Ключови думи: манкоцеб, *in ovo* тест, птичи ембрион, мутагенност, канцерогенност, ембриотоксичност

АНТРАЦЕНОВИ БИС-АМИНОФОСФОНАТИ: КРИСТАЛНА СТРУКТУРА,  
АНТИТУМОРНА АКТИВНОСТ *IN VITRO* И ГЕНОТОКСИЧНОСТ *IN VIVO*

Крайчева, Е. Воденичарова, Б. Шивачев, Р. Николова, А. Крил, М. Топашка-Анчева, И.  
Илиев, А. Георгиева, Ц. Герасимова, Т. Тошева, Е. Ташев, И. Цачева, К. Троев

Представени са рентгено-кристалографски данни за структурата на бис-аминофосфонати, получени от антрацен - 4,4'-бис [N-метил (диетоксифосфонил) -1- (9-антрил)] диаминодифенилметан (1) и 1,3-бис [N-метил (диетоксифосфонил) -1- (9-антрил)] диаминобензен (3). Рентгеноструктурният анализ показва, че и двете съединения кристализират по centrosymmetric начин и съдържат мезо-форма (1) и двойка енантиомери (3).

Цитотоксичният потенциал, генотоксичността и антипролиферативната активност на бис-аминофосфонати 1 и бис [N-метил (диетоксифосфонил) -1- (9-антрил)] бензидин (2), както и тяхното субклетъчно разпределение в туморни клетъчни култури, също се обсъждат. Съединения 1 и 2 показват оптимална антипролиферативна активност към човешки туморна клетъчна линия от карцином на дебелото черво HT-29. Изпитванията за безопасност *in vitro* и *in vivo* показват, че съединенията проявяват по-ниска токсичност за нормалните клетки в сравнение с добре познатите противоракови и цитотоксични средства.

Ключови думи: аминокиселини; монокристал; противотуморна активност; *in vitro* цитотоксичност; генотоксичност

НИСКА ЦИТОТОКСИЧНОСТ И КЛАСТОГЕННОСТ НА НЯКОИ ПОЛИМЕРНИ  
ПРОИЗВОДНИ НА АМИНОФОСФОНАТИ

Антон Крил, Маргарита Топашка-Анчева, Ани Георгиева, Иван Илиев, Цветелина  
Герасимова, Иванка Крайчева, Ивелина Цачева, Анита Богомилова, Елица  
Воденичарова, Кольо Троев

Полиоксиетилен аминоксиди, синтезирани на базата на биоразградими полифосфоестери и Шифови бази, бяха тествани *in vitro* за антитуморна активност срещу панел от шест човешки епителни ракови клетъчни линии, за цитотоксичност към миши фибробластни клетки и *in vivo* за кластогенност и антипролиферативни ефекти. Полимерите показват по-ниска цитотоксичност, както *in vivo*, така и *in vitro*, и по-ниска кластогенност *in vivo*, отколкото съответните нискомолекулни аминоксиди. Биологичната активност на тестваните полимери корелира с тяхната ниска *in vitro* антитуморна активност.

Ключови думи: поли (аминоксиди), човешки епителни неоплазии, клетъчни линии, изпитване за безопасност

СИНТЕЗ, ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ, АНТИТУМОРНА АКТИВНОСТ И ИЗПИТВАНЕ НА  
БЕЗОПАСНОСТТА НА НОВИ ПОЛИФОСФОЕСТЕРИ, НОСЕЩИ  
АМИНОФОСФОНАТНИ ЕДИНИЦИ, ПОЛУЧЕНИ ОТ АНТРАЦЕН

И. Крайчева, Е. Воденичарова, С. Шенков, Е. Ташев, Т. Тошева, И. Цачева, А. Крил, М.  
Топашка-Анчева, А. Георгиева, И. Илиев, И. Владов, Ц. Герасимова, К. Троев

Нови полифосфоестери, съдържащи аминоксфонатни единици, получени от антрацен, поли (оксиетилен аминоксфонат) и (4 и 5) и поли [оксиетилен (аминоксфонат-ко-Н-фосфонат)]и (6 и 7), бяха синтезирани чрез добавяне на поли (оксиетилен Н) -фосфонат и към 9-антрилиден-р-толуидин. Представени са IR, NMR (1H, 13C и 31P) и спектрални данни за емисиите на флуоресценция на полимерите. Съполимерите 6 и 7 бяха тествани за *in vitro* антитуморна активност върху панел от седем човешки епителни ракови клетъчни линии. Беше проведено изпитване за безопасност както *in vitro* (3T3 NRU тест), така и *in vivo* върху ICR мишки за генотоксичност и антипролиферативна активност. Съполимерът 7 показва отлична антипролиферативна активност към HBL-100, MDA-MB-231, MCF-7 и HepG2 клетъчни линии. Изпитванията за безопасност *in vitro* обаче показват значителна токсичност при миши ембрионални клетки Valb/c 3T3. За разлика от това, съполимер 6 показва пълна липса на цитотоксичност към Valb/c 3T3 клетки, но инхибира растежа на клетки от рак на гърдата, клетки от цервикален карцином (HeLa) и клетки от хепатоцелуларен карцином след продължителна (72 h) експозиция. Полимерите (4-6) проявяват ниска (4 и 6) до умерена (5) кластогенност *in vivo* и инхибират клетъчното делене на костния мозък по-слабо в сравнение с митомицин С. Вътреклетъчното разпределение на съполимерите 6 и 7 е изследвано в моделни клетъчно културални системи. Очаква се тестваните полифосфоестери да действат *in vivo* като пролекарства на аминоксфонати и могат да бъдат ценни като нов клас биоразградими полимерни лекарствени носители.

Ключови думи: полифосфоестери, аминоксфонове киселини, ЯМР, антитуморна активност, цитотоксичност, генотоксичност

**ЦИТОТОКСИЧНОСТ И ВЪТРЕКЛЕТЪЧНА ЛОКАЛИЗАЦИЯ НА ФУМОНИЗИН В1  
ПРИ ЕМБРИОНАЛНА КЛЕТЪЧНА ЛИНИЯ ОТ ПАТИЦА DEC 99**

Катерина Тодорова, Иван Иванов, Ани Георгиева, Симона Лазарова, Росица Милчева,  
Петър Димитров, Румен Димитров, Руси Русев

Проведено е сравнително проучване на цитотоксичния ефект на фумонизин В1 (FB1) върху клетъчни линии BALB/с 3Т3 и DEC 99. Клетъчна линия DEC 99 показва по-висока чувствителна от клетъчната линия BALB/с 3Т3, според проведения тест за поглъщане на багрилото неутрално червено. Светлинно микроскопските изследвания на DEC 99 клетъчни култури, третирани с FB1 показват променен монослой със свободни от клетки пространства и изобилие от мъртви клетки. Имуноцитохимичните техники (имунофлуоресцентно и имунозлатно маркиране) доказват проникването на токсина през клетъчните мембрани. Токсинът се визуализира в цитоплазмата и в ядрото на третираните клетки.

Ключови думи: фумонизин В1, клетъчна линия DEC 99, имуноцитохимия

ВЛИЯНИЕ НА ПРОТИВОРАКОВИЯ АГЕНТ ЕРУФОЗИН ВЪРХУ ПОВЕДЕНИЕТО  
НА ГРАФИ МИЕЛОИДНИ ТУМОРНИ КЛЕТКИ. ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА  
ЦИТОТОКСИЧНОСТ И РЕОРГАНИЗАЦИЯ НА ЦИТОСКЕЛЕТА

Веселина Узунова, Соня Апостолова, Ани Георгиева, Мартин Бергер, Ренета Тошкова,  
Румяна Цонева

В настоящото изследване имахме за цел да оценим ролята на цитотоксичността на еруфозин при предизвикване на промени в организацията на цитоскелета и индуциране на апоптоза в миелоидни туморни клетки на Graffi. Цитотоксичността на еруфозин беше установена чрез МТТ анализ. Ефектът на еруфозин върху цитоскелета и клетъчните ядра бяха оценени чрез имунооцветяване за  $\alpha$ -тубулин и F-актин, както и чрез оцветяване с DAPI. Ние показваме, че  $IC_{50}$  дозата на  $ERC_3$  при туморни клетки Graffi е 20  $\mu$ M. Флуоресцентните изображения показват наличието на апоптоза при същата концентрация на  $ERC_3$ . Индукцията на апоптоза от  $ERC_3$  е придружена от реорганизация на актина и тубулина. Получените резултати разкриват реорганизация на цитоскелета и индуциране на адхезивен клетъчен фенотип след третиране с еруфозин.

Ключови думи: еруфозин, реорганизация на цитоскелета, апоптоза, Графи туморни клетки

**IN VITRO АНТИТУМУРНА АКТИВНОСТ, ИЗПИТВАНЕ НА БЕЗОПАСНОСТ И  
ВЪТРЕКЛЕЧЕНО РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА ДВА ПОЛИ [ОКСИЕТИЛЕН  
(АМИНОФОСФОНАТ-СО-Н-ФОСФОНАТ)] И ПРИ АСЦИТЕН КАРЦИНОМ НА  
ЕХРИЛХ И VALB/C 3Т3 КЛЕТЪЧНО КУЛТУРАЛНИ СИСТЕМИ**

Ани Георгиева, Иван Илиев, Маргарита Топашка-Анчева, Иванка Крайчева, Ивелина  
Цачева, Емил Ташев, Таня Тошева и Антон Крил

Два полифосфоестера, съдържащи аминоксффонати, получени от антрацен и хидрофилни Н-фосфонатни субединици, поли [оксиетилен (аминоксффонат-ко-Н-фосфонат)] и (1 и 2), бяха тествани за *in vitro* антитуморна активност върху клетъчни култури, получени от асцитна форма на аденокарцином на млечната жлеза на Ерлих чрез тест за редукция на 3- (4,5-диметилтиазол-2-ил) -2,5-дифенилтетразолиев бромид (МТТ-тест). *In vitro* изпитването за безопасност на съполимерите беше осъществено чрез VALB/c 3Т3 тест за поглъщане на неутрално червено. Чрез флуоресцентна микроскопия беше изследвано тяхното проникване и вътреклетъчно разпределение при нетуморогенни и туморни клетки. И двата съполимера показват значителна антитуморна активност спрямо клетките от асцитен карцином на Ерлих (ЕАС). Изпитванията за безопасност *in vitro*, обаче показват значителна токсичност на полимер 2 при миши ембрионални клетки VALB/c 3Т3. Обратно, полимер 1 показва пълна липса на цитотоксичност за VALB/c 3Т3 клетки. Флуоресцентните проучвания показват, че веществата се разполагат дифузно в цитоплазмата и при двете клетъчно културални системи. За разлика от VALB/c 3Т3 клетките, при ЕАС клетките се наблюдава интензивен флуоресцентен сигнал в ядрата и в перинуклеарната област. Очаква се тестваните полифосфоестери да действат при физиологични условия като пролекарства на аминоксффонати.

Ключови думи: аминоксффонати, полифосфоестери, противотуморна активност, субклетъчно разпределение



ПОЛИ (3-ХИДРОКСИБУТИРАТ)/ЕЛЕКТРООВЛАКНЕНИ МАТЕРИАЛИ С  
КАФЕЕНА КИСЕЛИНА, ПОКРИТИ С ПОЛИЕЛЕКТРОЛИТЕН КОМПЛЕКС И  
ТЯХНОТО АНТИБАКТЕРНО ДЕЙСТВИЕ И *IN VITRO* АНТИТУМОРЕН ЕФЕКТ ПРИ  
HELA КЛЕТКИ

Милена Г. Игнатова, Невена Е. Манолова, Илия Б. Рашков, Надя Д. Маркова, Ренета А.  
Тошкова, Ани К. Георгиева, Елена Б. Николова

Целта на тази работа беше да се проучи възможността за получаване на нови влакнести материали с различна структура, получени от поли (3-хидроксибутират) (PHB)/полиетилен гликол (PEG), съдържащи природно фенолно съединение кафеена киселина (CA), както и да се проучи влиянието на състава на влакната върху профила на освобождаване на CA *in vitro* и върху биологичните свойства на влакнестите материали. Прилагането на техника за електроовлакняване позволи получаването на нановлакнести материали от PHB и PEG, натоварени с CA. Материали с целеви дизайн бяха получени чрез покритие с полиелектролитен комплекс от алгинат (Alg) и N, N, N-триметилхитозан (TMCh). За получаване на материалите са използвани три различни пътя на обработка: (i) с CA, включен в ядрото PHB/PEG; (ii) с CA, вграден в Alg слой; и (iii) с CA, включен в слоя TMCh. *In vitro* освобождаването на CA се модулира чрез контролиране на състава и архитектурата на нановлакнестите материали. Извършеният микробиологичен скрининг и проучванията за клетъчна жизнеспособност чрез МТТ-тест разкриха, че нановлакнестите материали съдържащите CA са ефективни при потискане на растежа на грам-положителните бактерии *Staphylococcus aureus* и грам-отрицателните бактерии *Escherichia coli* и показват добра цитотоксичност срещу човешки цервикални туморни клетки HeLa. В допълнение, пролиферацията на далачни лимфоцити и перитонеални макрофаги се увеличава в следствие на въздействието на изследваните нановлакнести материали, съдържащи CA. Получените материали са обещаващи както за антибактериални превръзки, така и за локално лечение на тумори на шийката на матката.

Ключови думи: електроовлакняване, кафеена киселина, поли (3-хидроксибутират), кватернизиран хитозан, антибактериална активност, противотуморна активност

**IN OVO ХЕПАТОКАНЦЕРОГЕННОСТ НА N-НИТРОЗОДИМЕТИЛАМИН И N-НИТРОЗОДИМЕТИЛАМИН ПРИ КОКШКИ БЯЛ ЛЕГХОРН**

А. Крил, А. Георгиева, Б. Николов, Р. Пепович, К. Христов, Г. Стоименов, Е. Николова, Р. Петрова, Й. Ананиев, Васил Манов

Птичите ембриони са обект на засилен научен интерес като ценна моделна система за експериментални изследвания върху рака, която би могла да допринесе за значително намаляване на опитите върху лабораторни животни. В настоящото изследване, чернодробните лезии, индуцирани от N-нитрозодиметиламин и N-нитрозодиетиламин при ембриони от кокошки Бял легхорн, линия 15I, бяха идентифицирани и изследвани чрез рутинни хистопатологични методи. Фокуси от променени хепатоцити с базофилен и еозинофилен фенотип, добре известни като пренеопластични изменения бяха идентифицирани в ембрионалния черен дроб на птиците след *in ovo* излагане на въздействието на двете N-нитрозо съединения. Тези проучвания бяха допълнително разширени чрез хистопатологични, хематологични и биохимични изследвания на ефектите на N-нитрозодиметиламин при пилета, излюпени от яйца, третирани с канцероген. В допълнение към пренеопластичните лезии, наблюдавани в черния дроб на птиците, беше установена пролиферация на овални и хепатоцелуларни карциномни клетки с ясно изразени признаци на злокачественост. Установено е, че *in ovo* прилагането на химичения канцероген влияе както на хематологичните, така и на биохимичните параметри на кръвта, измерени при опитни птици. Установените състояния като тромбоцитопения и повишени нива на чернодробните ензими, като съществена част от паранеопластичния синдром, са свързани с процеса на хепатоканцерогенеза. Резултатите от това проучване потвърждават пренеопластичната природа на фокалните лезии в ембрионалния птичи черен дроб и тяхното прогресиране до чернодробни неопластични изменения след еднократно *in ovo* приложение на известни хепатокарциногени. Нещо повече, резултатите показват, че ембрионите от кокошки Бял легхорн, линия 15I, са нов, ценен *in ovo* модел за изследване на хепатоканцерогенността на химичните съединения и подчертават значението на разработването на различни модели за изследвания за канцерогенност.

Ключови думи: *in ovo* модели, птичи ембриони, нитрозамини, хепатокарциногенеза

## ЕЛЕКТРООВЛАКНЕНИ МАТЕРИАЛИ ОТ ПОЛИ(ε -КАПРОЛАКТОН) С ПОКРИТИЕ ОТ ХИТОЗАН/ФЕРУЛОВА КИСЕЛИНА С АНТИОКСИДАНТНИ, АНТИБАКТЕРНИ И АНТИТУМОРНИ СВОЙСТВА

Гюлджан Якуб, Милена Игнатова, Невена Манолова, Илия Рашков, Ренета Тошкова,  
Ани Георгиева, Надя Маркова

Нови влакнести материали от поли (ε -капролактон) (PCL), хитозан (Ch) и природна фенолна киселина - ферулова киселина (FA), с различен дизайн бяха успешно получени чрез електроовлажняване или електроовлажняване, комбинирано с потапяне. FA, включена във PCL влакнести материали или в покритието от Ch, е в аморфно състояние, както се вижда от извършения анализ чрез диференциална сканираща калориметрия (DSC) и рентгенова дифракция (XRD). Освобождаването на FA е повлияно от състава и дизайна на полимерната матрица. Включването на комбинация от FA и Ch във влакнестите материали им придава по-висока активност срещу патогенни бактерии *S. aureus*, отколкото тази на материалите, съдържащи само FA или само покрити с Ch. Влакнестите материали, съдържащи FA, както и тези, покрити с Ch или Ch-FA, инхибират адхезията на бактериите *S. aureus*. Освен това, FA запазва своята антиоксидантна активност, когато е включена във влакната или в покритието с Ch. Установено е, че цитотоксичността на всички видове материали, съдържащи FA срещу туморни клетки HeLa е по-висока от тази на свободната FA. По този начин получените влакнести материали могат да бъдат подходящи кандидати за приложение като превръзки за рани и при локално лечение на тумори на шийката на матката.

Ключови думи: електроовлажняване, ферулова киселина, хитозан, антиоксидантна активност, антибактериална активност, противотуморна активност

ЕЛЕКТРООВЛАКНЕНИ МЕМБРАНИ ОТ ЦЕЛУЛОЗЕН АЦЕТАТ, ДЕКОРИРАНИ С  
ЧАСТИЦИ ОТ КУРКУМИН-PVP: ПОЛУЧАВАНЕ, АНТИБАКТЕРНА И  
АНТИТУМОРНА АКТИВНОСТ

Петя Цекова, Мария Спасова, Невена Манолова, Илия Рашков, Надя Маркова, Ани  
Георгиева, Ренета Тошкова

Куркуминът (Curc) проявява противовъзпалително, антибактериално и антитуморно действие. Неговото клинично приложение, обаче е ограничено от ниската бионаличност, свързана с изключително слабата му разтворимост във вода. Получени бяха нови материали, позволяващи засилено освобождаване на Curc във водна среда. Новите материали се състоят от влакна получени чрез електроовлакняване от целулозен ацетат (CA) (среден диаметър на влакното около 780 nm  $\pm$  110 nm) и електроразпръскване на частици Curc/поливинилпиролidon (Curc/PVP). Сканиращата електронна микроскопия (SEM) показва, че отделени и равномерно разпределени частици Curc/PVP са отложени върху повърхността и във вътрешните слоеве на материала. Изследванията с рентгенова дифракция показват, че Curc е в аморфно състояние. *In vitro* проучванията показват, че освобождаването на Curc е улеснено при материалите Curc/PVP-on-CA (около 78% за 24 часа) в сравнение с материалите, в които Curc е включен в CA влакна (17% за 24 часа). Освен това съдържащите куркумин материали проявяват антибактериална активност срещу грам-положителни бактерии *Staphylococcus aureus* и грам-отрицателни бактерии *Escherichia coli*. Curc/PVP-on-CA влакнестите материали показват висока *in vitro* цитотоксичност спрямо HeLa туморни клетки. Следователно, получените материали са обещаващи за антибактериални превръзки за рани, както и за приложение при локално лечение на тумори на шийката на матката.

## МЕТАМИЗОЛ (ДИПИРОН)-ЦИТОТОКСИЧНИ И АНТИПРОЛИФЕРАТИВНИ ЕФЕКТИ ПРИ HELA, HT-29 И MCF-7 РАКОВИ КЛЕТКИ

Ирина Николова, Любомир Маринов, Ани Георгиева, Ренета Тошкова, Мартин  
Малчев, Юлиан Войников и Иванка Костадинова

Лечението на раковата болка е голямо предизвикателство както за медицинските работници, така и за пациентите. Широката гама от нестероидни противовъзпалителни средства (НСПВс), използвани като болкоуспокояващи при пациенти с рак, изисква задълбочена характеристика на техния ефект върху болестния процес. Ефектите на НСПВс са широко изследвани през последните десетилетия като превантивни лекарства при някои онкологични заболявания. Метамизолът е НСПВс, принадлежащ към групата на ненаркотичните аналгетици и се препоръчва силно в онкологията, самостоятелно или в комбинация с опиоидни аналгетици. Поради недостига на информация относно профила на цитотоксичност на метамизол настоящото изследване оценява потенциалната противоракова активност на метамизол при постоянни човешки туморни клетъчни линии: HeLa - рак на шийката на матката; HT-29 - колоректален аденокарцином; и MCF-7 - аденокарцином на млечна жлеза. Изследваните туморни клетки са чувствителни към метамизол при дози по-високи от 25 µg/mL. Метамизолът индуцира статистически значимо намаляване на жизнеспособността на клетките на HeLa, HT-29 и MCF-7 в *in vitro* тестове, установено чрез МТТ анализ; най-силен ефект се наблюдава на 48-ия час на третирането. Метамизолът може да предизвика клетъчна смърт чрез апоптоза. Метамизолът също потиска миграцията на трите туморни клетъчни линии. Това е най-ясно изразено при HeLa клетките. Получените резултати показват, че метамизолът е подходящ избор за лечение на ракова болка и има перспективи за по-задълбочени проучвания.

Ключови думи: метамизол, апоптоза, цитотоксичност, тест за заздравяване на рани, пролеферация; миграция

## МОЛЕКУЛЯРНА ДЕТЕКЦИЯ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ НА ШЕСТ ВИРУСА ПРИ ПЧЕЛНИ (*APIS MELLIFERA*) КОЛОНИИ В БЪЛГАРИЯ

Росица Шумкова, Бойко Неов, Даниела Сиракова, Ани Георгиева, Димитър Гаджев, Деница Теофанова, Георги Радославов, Мария Буга и Петър Христов

Пчелните семейства страдат от различни патогени, включително вируси при медоносните пчели. До момента са известни около 24 вируса. Счита се обаче, че шест от тях причиняват тежки инфекции, които нанасят големи загуби на пчеларството. Целта на това проучване е да се изследва разпространението от шест вируса при медоносните пчели: деформиращ крилата вирус (DWV), вирус на остраия паралич (ABPV), вирус на хроничния паралич (CBPV), вирус на мехурчестия гнилец (SBV), кашмирски вирус (KBV) и вирус на черната пчелна майка (BQCV), чрез обратна транскриптазна полимеразна верижна реакция (RT-PCR). Бяха получени общо 250 проби от възрастни пчели, от 50 колонии, от осем пчелина, разположени в три различни части на страната (Южна, Северна и Западна България). Резултатите показват най-широко разпространение на DWV, последвано от SBV и ABPV и един случай на BQCV. Сравнение с хомоложни последователности, налични в GenBank, беше извършено чрез филогенетичен анализ, а филогенетичните връзки бяха обсъдени в контекста на новоописаните генотипове в неизследвания Югоизточен регион на Европа. В заключение, настоящото изследване е първото, което предоставя секвенционни данни и филогенетичен анализ на някои вируси при медоносните пчели в България.

Ключови думи: вируси при медоносни пчели, RT-PCR, *Apis mellifera*, България

## БИОТИЧНИ И АБИОТИЧНИ ФАКТОРИ, СВЪРЗАНИ СЪС СМЪРТНОСТТА ПРИ ПЧЕЛНИТЕ (*APIS MELLIFERA*) КОЛОНИИ

Бойко Неов, Ани Георгиева, Росица Шумкова, Георги Радославов, Петър Христов

Въпреки наличието на голям брой опрашители на цъфтящите растения по целия свят, европейската медоносна пчела, *Apis mellifera*, играе най-важната роля в опрашването на редица култури, включително всички зеленчуци, нехранителни култури и маслодайни култури, декоративни и медицински растения и др. Опитът от единични случаи на пълно изчезване на медоносните пчели в отделни региони показва, че това явление води до драматична криза на опрашването и намалена способност или дори пълна невъзможност за отглеждане на опрашвани от насекоми култури, ако се разчита единствено на местни естествени опрашители. Настоящите научни данни показват, че между Креда и Палеогена е настъпило глобалното изчезване на пчелите, което е довело до изчезването на цветята, тъй като те не са могли да произвеждат жизнеспособни плодове и да покълват поради липса на опрашване от пчели или други животни. От Средновековието до наши дни има доказателства, че медоносните пчели винаги са преодолявали неблагоприятните фактори, които са ги засягали през вековете, след което популацията им се е възстановила напълно. Този факт трябва да се третира с голямо внимание, като се има предвид появата през втората половина на 20 век на нов, широко разпространен стрес-фактор - интоксикация на кошерите с антибиотици и акарициди и третиране на посевите с пестициди. Наред с острата и хронична интоксикация на пчелите и пчелните продукти, има и други нови големи стресори от световно значение, намаляващи броя на пчелните семейства: широко разпространение на патогенни организми и вредители, изменение на климата и неблагоприятни климатични условия, промени в ландшафта и ограничаване на естествените местообитания, интензифициране на селскостопанското производство, неадекватно хранене и въвеждане на инвазивни видове. Този доклад обобщава въздействието на отделните негативни фактори върху здравето и поведението на пчелите, за да се ограничат комбинираните ефекти на горните стресори.

Ключови думи: *Apis mellifera*, загуби на пчелни семейства, биотични фактори, абиотични фактори

АНТИПРОЛИФЕРАТИВНИ И АПОПТОГЕННИ ЕФЕКТИ НА МИОЗМИН ПРИ  
ЕРИТРОЛЕВКЕМИЧНИ И ХЕПАТОЦЕЛУЛНИ КАРЦИНОМНИ КЛЕТКИ

Рада Матева, Ани Георгиева, Иван Илиев, Ренета Тошкова и Тамара Пайпанова

Миозмин, 3-(1-пирилин-2-ил) пиридин е алкалоид, съдържащ се в тютюна, който се открива също и в различни широко използвани храни. Напоследък този фитохимикал е обект на все по-голям интерес като потенциален рисков фактор за развитието на езофагеален аденокарцином. Това проучване има за цел да се изследват ефектите на миозмина върху клетъчната жизнеспособност и пролиферативната активност на клетките от еритролевкемия и хепатоцелуларен карцином и да получи допълнителна информация за механизмите, лежащи в основата на неговата цитотоксична активност. *In vitro* цитотоксичният ефект на миозмина върху туморните клетъчни линии на HepG2 и MEL беше оценена чрез тест за редукция на багрилото МТТ и тест за изключване на багрилото с трипаново синьо. Промените в морфологията на туморните клетки, предизвикани от миозмина, бяха анализирани чрез флуоресцентна микроскопия след оцветяване с акридин оранж (АО)/етидиев бромид (EtBr) и 40,6-диамидин-20-фенилиндол дихидрохлорид (DAPI). Оцветяване с анексин V-FITC/пропидиев йодид (PI) беше използвано за да се оцени способността на миозмина на предизвиква апоптоза. Модулиращото действие на антиоксиданти върху индуцираната от миозмин цитотоксичност срещу HepG2 туморната клетъчна линия също беше изследвано. Тестовите за клетъчна жизнеспособност показват, че миозминът предизвиква значително дозо-зависимо намаляване на жизнеспособността и пролиферативната активност на двете туморни клетъчни линии. Флуоресцентно микроскопските изследванията разкриват значителни промени в морфологията на туморни клетки, третирани с миозмин, с белези на блокиране на клетъчния цикъл и апоптоза. Резултатите от едновременното третиране с миозмин и витамин С показват модулираща активност на витамин С върху цитотоксичния ефект на миозмина, варираща в зависимост от концентрацията и времето на третиране. Представените резултати биха могли да допринесат за оценката на потенциалните рискове за здравето, свързани с хранителното излагане на въздействието на миозмин.

Ключови думи: миозмин; апоптоза; антиоксиданти; витамин С; оксидативен стрес



## УСТОЙЧИВОСТ НА МЕСТНИ МЕДОНСНИ ПЧЕЛИ ОТ РОДОПИТЕ И ОТ РАВНИННИ РЕГИОНИ НА БЪЛГАРИЯ КЪМ НОЗЕМА ЦЕРАНА И ВИРУСНИ ПАТОГЕНИ

Р. Шумкова, Б. Неов, А. Георгиева, Д. Теофанова, Г. Радославов, П. Христов

Западната медоносна пчела (*Apis mellifera L.*, Hymenoptera: Apidae) е вид с важно икономическо, земеделско и екологично значение. Целта на това изследване е да се сравни разпространението на някои паразитни и вирусни патогени при местните медоносни пчели от Родопите и от равнинни региони. За да се постигне тази цел, беше проведен молекулярен скрининг за два от най-разпространените видове Nosema. Извършена беше и молекулярна идентификация на шест вируса при медоносните пчели: деформиращ крилата вирус (DWV), вирус на остраия паралич (ABPV), вирус на хроничния паралич (CBPV), вирус на мехурчестия гнилец (SBV), кашмирски вирус (KBV) и вирус на черната пчелна майка (BQCV). Молекулярният анализ беше извършен върху 168 проби от пчелини, разположени в три различни части на страната, където се отглеждат различни подвидове на медоносната пчела. В Южна България (Родопите) се отглежда местна медоносна пчела, наречена *Apis mellifera rodopica* (местен екотип на *A. m. Macedonica*), докато в другите два региона (равнини) съществуват различни въведени подвидове. Резултатите показват, че пробите от равнинните региони в страната се характеризират с най-голямо разпространение на *N. Ceranae* (70,5%), докато тези от планинските части са с най-ниска честота (5,2%). Идентифицирани са четири от вирусите при медоносните пчели - DWV (10/5,9%), последвано от SBV (6/3,6%) и ABPV (2/1,2%), и един случай на BQCV. В заключение, при местните медоносни пчели *A. m. rodopica* (въпреки по-големия брой проби) се установява по-слабо разпространение както на нозематоза, така и на вирусни инфекции. Следователно тази пчела трябва да бъде запазена като част от националното биоразнообразие.

Ключови думи: *Apis mellifera*, България, болести по пчелите, молекулярна детекция

## ХЕМОЦИАНИНИ ОТ ОХЛЮВИ *HELIX* И *RAPANA* ПРОЯВЯВАТ *IN VITRO* АНТИТУМОРНИ ЕФЕКТИ ПРИ ЧОВЕШКИ КОЛОРЕКТЕН АДЕНОКАРЦИНОМ

Георгиева А., Тодорова К., Илиев И., Дилчева В., Владов И., Петков, С. Тошкова, Р.,  
Велкова Л., Долашки А., Долашка П.

Хемоцианините са транспортиращи кислород гликопротеини в хемолимфата на членестоноги и мекотели, които привличат научен интерес със своите разнообразни биологични активности и потенциални приложения във фармацията и медицината. Целта на настоящото изследване е да се оцени *in vitro* анти tumorната активност на хемоцианини, изолирани от морски охлюв *Rapana venosa* (RvH) и градински охлюви *Helix lucorum* (HhH) и *Helix aspersa* (HaH), както и мукус от охлюви *H. aspersa* при клетъчната линия от човешки колоректален карцином HT-29. Ефектите на хемоцианините върху клетъчната жизнеспособност и пролиферацията бяха анализирани чрез 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид (МТТ) тест и промените в морфологията на туморните клетки бяха изследвани чрез флуоресцентна и трансмисионна електронна микроскопия. Резултатите от МТТ анализа показват, че мукуса и  $\alpha$ -субединицата на хемоцианин от охлюва *H. aspersa* имат най-значима антипролиферативна активност от изследваните проби. Цитоморфологичният анализ разкри, че наблюдаваните анти tumorни ефекти са свързани с индуциране на апоптоза в туморните клетки. Представените данни показват, че хемоцианините и слюзта от *H. aspersa* имат антинеопластична активност и потенциал за разработване на нови терапевтични средства за лечение на колоректален карцином.

Ключови думи: хемоцианин, охлюв *Rapana venosa*, охлюв *Helix lucorum*, охлюв *Helix aspersa*, противотumorна активност, колоректален аденокарцином, апоптоза

## АНТИПРОЛИФЕРАТИВНА И АНТИТУМОРНА АКТИВНОСТ НА САПОНИНИ ОТ *ASTRAGALUS GLYCYPHYLLOS* ПРИ МИЕЛОИДЕН ТУМОР НА ГРАФИ

Ани Георгиева, Георги Попов, Александър Шкондров, Ренета Тошкова, Илина

Кръстева, Магдалена Кондева-Бурдина, Васил Манов

Етнофармакологично значение: *Astragalus glycyphyllos* е широко използван в българската народна медицина като антихипертензивно, диуретично, противовъзпалително и противотуморно средство, както и в случаи на сърдечна недостатъчност, бъбречно възпаление, калкулоза и др.

Цел на изследването: Да се оцени потенциалната *in vitro/in vivo* антипролиферативна/анти tumorна активност на пречистена смес от сапоници (PSM), получена от растението.

Материали и методи: Жизнеспособността и пролиферативната активност на клетките от миелоиден тумор на Graffi бяха оценени чрез МТТ тест. Морфологичните промени бяха визуализирани и анализирани чрез флуоресцентна микроскопия след двойно интравитално оцветяване. *In vivo* модел на хамстери с тумор на Graffi, беше използван за изследване влиянието на PSM върху трансплантируемостта, растежа на тумора, преживяемостта и смъртността, както и за установяване на патоморфологични промени.

Резултати: Клетките от тумор на Графи са чувствителни към пречистената сапонинова смес след 24 и 48 часа третиране. Третирането предизвиква статистически значимо намаляване на жизнеспособността/пролиферацията на туморните клетки на Графи. Тези ефекти са зависими от концентрацията и времето на третиране. Флуоресцентно микроскопските изследванията показват, че тези антипролиферативни ефекти са свързани с индуцирането на апоптоза. Проучването *in vivo* показва наличие на стромален компонент с единични моноклеарни клетки в стромата. В туморната тъкан от контролната група се наблюдават множество неправилни митотични фигури. Добре оформена строма с натрупване на моноклеарни клетки и митотични клетки се откриват в групата с PSM третиране. Теглото на тумора е намалено в групата, третирана с PSM.

Заклучение: Резултатите показват, че PSM проявява *in vitro/in vivo* антипролиферативни/анти tumorни ефекти.

Ключови думи: *Astragalus glycyphyllos*, противотуморен, цитотоксичност, сапоници

## АНТИНЕОПЛАСТИЧНИ ЕФЕКТИ НА ЕРУФОЗИН ПРИ МИЕЛОИДЕН ТУМОР НА ГРАФИ ПРИ ХАМСТЕРИ

А. К. Георгиева, Р. А. Гошкова, К. С. Тодорова, Р. Д. Цонева

Ракът се превърна в едно от най-значимите здравни предизвикателства, както за хуманната, така и за ветеринарната медицина. В настоящото изследване е проучена антинеопластичната и антиметастатичната активност на новия антираков агент еруфозин, действащ върху клетъчните мембрани. Противотуморните ефекти на еруфозин върху експериментален миелоиден тумор при хамстери, индуциран от вируса на Графи бяха изследвани чрез хистопатологични методи и оценка на някои биометрични параметри на туморния растеж. Бяха приложени две схеми на експериментална антитуморна терапия – при едната, третирането беше започнато едновременно с трансплантацията на тумора, а при другата - след появата на палпируеми тумори. Резултатите демонстрират протективен противотуморен ефект на еруфозин, изразен чрез намаляване на трансплантируемостта, инхибиране на туморния растеж, потискане на метастатичната активност и удължаване на средното време на преживяемост. Ефективността на експерименталната терапия е по-изразена, когато е започната едновременно с трансплантацията на туморните клетки. Представените резултати предполагат, че еруфозинът е обещаващ лекарствен кандидат за лечение на хематологични злокачествени заболявания.

Ключови думи: алкилфосфохолини, противотуморна активност, еруфозин, миелоиден тумор

## ЦИТОТОКСИЧНИ И АНТИПРОЛИФЕРАТИВНИ ЕФЕКТИ НА НЕСТЕРОИДНОТО ПРОТИВЪПАЛИТЕЛНО ЛЕКАРСТВО ДИКЛОФЕНАК ПРИ ЧОВЕШКИ ТУМОРНИ КЛЕТКИ

Маринов Л., Георгиева А., Войников Ю., Тошкова Р., Николова И., Малчев М.

Диклофенак е едно от най-често предписваните нестероидни противовъзпалителни средства (НСПВс) за остри и хронични възпалителни състояния. Като се има предвид широкото използване на диклофенак, ключовата роля на възпалението в процеса на туморогенеза и данните за ефектите на НСПВс върху раковите клетъчни линии, ние изследвахме цитотоксичния потенциал на диклофенак върху панел от човешки клетъчни линии, произхождащи от рак на гърдата (MCF-7), рак на шийката на матката (HeLa) и колоректален карцином (HT-29). Цитотоксичността беше оценена, чрез използване на теста за редукция на багрилото на 3- (4,5-диметилтиазол-2-ил) -2,5-дифенилтетразолиев бромид (МТТ) и определяне на 50% инхибиторни концентрации (IC<sub>50</sub>). Диклофенак показва по-висока ефективност срещу MCF-7 и HT-29, отколкото срещу HeLa клетките. Клетъчните и ядрените промени бяха изследвани чрез флуоресцентна микроскопия, след оцветяване с 4', 6'-диамино-2-фенилиндол (DAPI) и акридин оранж/етидиев бромид (АО/ЕВ). Тестът за миграция на туморни клетки показва значително намаляване на миграционния капацитет на всички тествани ракови клетъчни линии. Наблюдаваната антинеопластична активност предполага, че противораковият потенциал на НСПВс и по-специално на диклофенак налага по-нататъшно изследване.

Ключови думи: диклофенак, апоптоза, цитотоксичност, тест за зарастване на рани, пролиферация, миграция