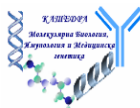


ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СТАРА ЗАГОРА

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Катедра “Молекулярна биология, имунология и
медицинска генетика“



**ВЛИЯНИЕ НА ТОТАЛЕН ЕКСТРАКТ ОТ
HABERLEA RHODOPENSIS ВЪРХУ ЕКСПРЕСИЯТА НА
ТУМОРСУПРЕСОРНИ ГЕНИ И ГЕНИ УЧАСТВАЩИ В
РЕПАРАЦИЯТА НА ДНК**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на ОНС „Доктор“

Професионално направление: 4.3. „Биологически науки“
Научна специалност: „Генетика“

на

Нели Атанасова Димитрова

Научен ръководител:

доц. д-р Борислав Николов Попов, дм

Стара Загора – 2026

Дисертационният труд съдържа 185 стандартни машинописни страници и е онагледен с 25 таблици и 39 фигури. Цитирани са 338 литературни източника, от които 5 са на кирилица.

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за официална защита на разширено заседание на катедрен съвет на катедра „Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика“ на Медицински факултет при Тракийски университет-Стара Загора.

Публична защита на дисертационният труд ще се състои на от часа в Академична зала на Медицински факултет, Стара Загора пред научно жури в състав:

Проф. Нели Христова Грозева, дбн

Проф. Татяна Иванова Влайкова, дб

Проф. Мария Христова Казакова-Велинова, дб

Доц. Сена Карачанак-Янкова, дб

Доц. Веселина Стоянова Мерхар, дб

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на Тракийски университет-Стара Загора и са на разположение в „Научен отдел“ на Медицински факултет-Стара Загора.

СЪДЪРЖАНИЕ

	Стр.
ВЪВЕДЕНИЕ.....	5
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	7
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	8
РЕЗУЛТАТИ.....	13
ДИСКУСИЯ.....	42
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	56
ИЗВОДИ.....	57
ПРИНОСИ.....	59
Списък на публикации във връзка с дисертационния труд.....	61
Научно-изследователски проекти във връзка с дисертационния труд	62
SUMMARY.....	63
БИБЛИОГРАФИЯ.....	65

Списък на най-често използваните съкращения:

На кирилица:

ДНК- дезоксирибонуклеинова киселина

РНК- рибонуклеинова киселина

ЙР- йонизираща радиация

мРНК- матрична рибонуклеинова киселина

На латиница:

HER- *Haberlea Rhodopensis* extract

ROS- високореактивни кислородни продукти

H₂O₂- водороден пероксид

NHEJ- нехомоложна рекомбинация със свързване на краищата

HR- хомоложна рекомбинация

ATM- ataxia telangiectasia mutated

PUMA- p53 upregulated modulator of apoptosis

TP53- тумор протеин p53

BRCA 1- Breast Cancer gene 1

RAD51- RAD51 Recombinase

CDKN1A- cyclin-dependent kinase inhibitor 1A

BBC3- Bcl-2-binding component 3

GAPDH- глицералдеhid-3-фосфат дехидрогеназа

HPLC- Високоэффективна течна хроматография

FACS- fluorescence-activated cell sorting

RQ-Relative concentration

SD-Standard deviation

qRT PCR- Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

ВЪВЕДЕНИЕ

През последните години интересът на изследователите е насочен към природните продукти, особено на тези с растителен произход. Широкото им разпространение и дългогодишната им употреба в народната медицина насочва вниманието към техния антимуtagenен, антиканцерогенен и радиопротективен потенциал. Идеалният антимуtagen трябва да бъде нетоксичен в широк дозов диапазон, с възможност за неинвазивно (орално) приложение, да се характеризира с бърза абсорбция, висока стабилност и достъпност, както и с широк спектър на действие върху различни прицелни клетки и тъкани. Би следвало да модулира различни клетъчни механизми участващи, в мутагенезата, включително механизмите на ДНК репарация, регулация на клетъчния цикъл, клетъчната смърт и други. Високата токсичност и страничните действия на изкуствено синтезирани химични антимуtagени и радиопротектори е стимул да се търсят алтернативни субстанции от естествен произход, които да са с по-ниска токсичност и по-висока ефективност.

В хода на еволюцията, растенията са развили способността да синтезират изключително разнообразни фитохимични субстанции, които в много отношения често превъзхождат по биологична активност продуктите на синтетичната химия. Растенията представляват един неизчерпаем източник за разработване и внедряване на нови лекарствени вещества. Често, биологично активните субстанции от растителен произход винаги са добра основа за по-нататъшни химични преобразувания и модели за синтез на нови съединения. Интересът към растенията и техните естествени биологично активни продукти непрекъснато нараства, но за тяхното приложение в практиката като антигенотоксини е наложителен задълбочен анализ на техните свойства и строго валидиране на ефективността им.

Растителните екстракти съдържат освен основно активно вещество и редица други съставки като биогенни амини,

аминокиселини, микроелементи, витамини и други. В организма те могат да повлияват важни физиологични процеси включително белтъчния синтез, имунологични отговор, ензимна концентрация или активност, елиминиране на свободни радикали, повишаване на нивата на клетъчните антиоксиданти, повлияване и засилване механизмите на репарация на ДНК и др. Тези комбинирани ефекти на растителните екстракти, често водят до по-силно изразени свойства в сравнение с изолирани химически чисти биологично активни вещества.

Haberlea rhodopensis (Родопски силивряк) от рода Gesneriaceae, субфамилия Didymocarpeae, е балкански реликтен ендемит, който в България е разпространен основно в Родопите и в някои части на Централна Стара планина. Съществуващите литературни данни сочат *H. rhodopensis* като източник на биологично активни субстанции с антиоксидантен и цитопротективен ефект. Необходимостта от откриването на нови природни продукти с антимуtagenен, антиканцерогенен и радиопротективен потенциал, поставят *H. rhodopensis* като обект на настоящото проучване.

Настоящият дисертационен труд има за цел чрез съвременни молекулярно-генетични методи да изследва влиянието на тоталния екстракт от *H. rhodopensis* върху експресията на ключови гени участващи, в процесите на ДНК – репарация, контрол на клетъчния цикъл и програмираната клетъчна смърт (апоптоза) в клетъчни култури, изложени на въздействие с физични и химични мутагени в *in vitro* условия.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ:

Проучване на влиянието на тотален екстракт от *H. rhodopenensis* върху експресията на гени, участващи в процесите на ДНК репарация, контрол на клетъчния цикъл и апоптоза, които подпомагат отговора на клетките отглеждани в *in vitro* условия подложени на йонизиращи лъчения и оксидативен стрес.

ЗАДАЧИ:

1. Да се изготви стандартизиран тотален екстракт от *H. rhodopenensis* за извършване на анализи с клетъчни култури.
2. Да се определят подходящи концентрации на етаноловия екстракт от *H. rhodopenensis* и схема на третиране с екстракта преди и след облъчване на клетъчните култури с гама-радиация на клетъчна линия HeLa.
3. Да се определят подходящи концентрации на етаноловия екстракт от *H. rhodopenensis* и схема на третиране с екстракта преди и след третирането на клетъчните култури с H_2O_2 на клетъчна линия HeLa.
4. Да се анализира нивото на експресия на гените (*TP53*, *BRCA1*, *ATM*, *RAD51*, *RAD50*, *CDKN1A* и *BBC3*) след въздействие с тотален етанолов екстракт от *H. rhodopenensis* и облъчване на културите с γ -радиация.
5. Да се анализира нивото на експресия на гените (*TP53*, *BRCA1*, *ATM*, *RAD51*, *RAD50*, *CDKN1A* и *BBC3*), след въздействие с тотален етанолов екстракт от *H. rhodopenensis* и третиране с H_2O_2

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

1.1. Клетъчна линия

За провеждане на експерименталната работа беше използвана човешка туморна клетъчна линия HeLa (ATCC® CCL-2™, Манасас, Вирджиния, САЩ)

1.2 Тотален екстракт от *H. rhodopenensis*

Листната маса от *H. rhodopenensis* се изсушаваше на тъмно, при стайна температура за периода от един месец. Последваха етапи на оситняване до размер от 1 мм на частиците и мацериране в перкулатор за 6 часа, като се добавяше трикратен обем от 70% етилов алкохол (Българска Фармакопея, Свитък 3, стр.218, $d^{20} = 0.887$). Средното количество екстрактивни вещества, които получихме беше от $105 \times 10^{-3} \text{ g/cm}^3$.

2. Методи

2.1. Високоэффективна течна хроматография (HPLC)

Изследването е проведено в Катедра „Индустриална микробиология“, Лаборатория по приложни биотехнологии, Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, Българска академия на науките (Пловдив, България) в сътрудничество с Innova Ltd. (София, България).

Използвания в научната разработка екстракт от листа на *H. rhodopenensis* беше анализиран с помощта на метода високоэффективна течна хроматография (High Performance Liquid Chromatography-HPLC). HPLC системата използвана за изследването се състои от двоен λ абсорбционен детектор Waters 2487, бинарна помпа Waters 1525 и софтуер Breeze 3.30 (Waters, Milford, MA, USA). Разделянето на молекулите беше извършено с колона Kinetex® (100 mm $\times$ 2.1 mm, 5 μm ; Phenomenex, Torrance, CA, USA), скорост на потока 0.6 mL/min при поддържана температура 26 °C. За определяне на миконазид бяха използвани елуенти 2% оцетна киселина (разтворител А) и ацетонитрил (разтворител Б). Крайните условия на градиента са посочени в таблица 1 :

Таблица 1. Крайни условия на градиента при определяне на миконазид, чрез HPLC

Време(мин.)	Количество поток (мл/мин)	%А	%Б
0	0.6	80.0	20.0
12	0.6	80.0	20.0
15	0.6	50.0	50.0
17	0.6	80.0	20.0
20	0.6	80.0	20.0

Последващите експерименти са проведени в Лаборатория по Молекулярна генетика на дрожди, Институт по молекулярна биология, „Академик Румен Цанев“ (ЛМГД), към БАН, гр. София.

2.2. Клетъчно култивиране

За култивиране на клетъчната линия HeLa беше използвана хранителна среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) с добавени към нея 10% фетален телешки серум (FBS media), 2 mM L-глутамин и антибиотик (100 U пеницилин/ 0,1 мг/мл стрептомицин). Клетките се инкубираха в термостат при 37°C и 5% CO₂ до достигане на концентрация приблизително 1,6x10⁶ клетки/мл.

2.3. Третиране на клетъчна линия HeLA с различни концентрации на тотален HRE

Клетъчните култури са разпределени в сетове , като всеки сет включваше ямка (2 мл) без добавен екстракт и 3 ямки, към които беше добавен HRE с 3 различни концентрации във възходящ ред съответно по 10 µg/ml, 25 µg/ml и 50 µg/ml).

2.4. Третиране на клетъчната линия с γ-радиация

Един час след третиране с HRE половината от сетовете бяха облъчени в Национален център по радиология и радиационна защита - гр.София (НЦРРЗ) с 2 Gy γ-IR. Сумарното време за третиране с HRE беше 3 часа и 15 мин.

2.5. Третиране на клетъчната линия с H₂O₂

Всички сетове бяха инкубирани в термостат за 1 час на 37°C след добавяне на екстрата. За всеки експеримент бяха използвани по 2 сета с клетки. Един без допълнително третиране с 10 mM H₂O₂

и втори при, който към всяка от пробите добавихме по 2,26 мкл от 8.82 mM H₂O₂, като така във всяка проба крайната концентрация на H₂O₂ е 10 mM за 2 мл среда.

2.6. Тест с трипаново синьо

За да определим клетъчната концентрация и преживяемост на клетъчна линия HeLa след третиране с различните концентрации на HRE и последващи въздействия с γ радиация и H₂O₂ извършихме тест с трипаново синьо.

Използвахме следната формула за изчисление на получените резултати:

$$C=N \times 1.10^4/n$$

където **C** е клетъчната концентрация, **N**- броя на преброените клетките, **n**- броя на преброените квадрати.

2.7. Флуоцитометричен анализ, чрез флуоресцентно активирано клетъчно сортиране (fluorescence-activated cell sorting-FACS)

Анализът на клетките беше осъществен с флуоцитометър BD FACS Canto™ (Becton, Dickinson & Company, Franklin Lakes, NJ, USA). От всяка проба се измерваха 100 000 клетки, като процентното им съотношение беше изчислено със софтуер FlowJo v10 (Becton, Dickinson & Company, Franklin Lakes, NJ, USA). Разпределението на клетките беше измерено спрямо параметрите FSC-H (определя размера на клетката), SSC-H (определя гранулираността на клетката) и FL-2A (определя количественото съдържание на ДНК).

2.8. Изолиране на тотална РНК от HeLa клетки, третирани с тотален HRE и/или 2 Gy гама радиация и/или H₂O₂

За изолиране на тотална РНК от клетъчна култура HeLa използвахме търговски кит GeneJET™ RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA); Принципа на работа е на база колонна хроматография. Екстракцията беше проведена по протокол за Mammalian Cultured Cells Total RNA Purification на съответният кит.

2.9. Спектрофотометрично измерване на тотална РНК

За спектрофотометричното определяне на концентрацията и чистотата на тоталната РНК беше използван апарат NanoDrop-1000

(NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE) при дължина на вълната (λ) от 260 nm.

2.10. Пречистване тоталната РНК за елиминиране на остатъчно количество геномна ДНК

С цел елиминиране на остатъчни количества геномна ДНК, пробите с тотална РНК бяха третираны с RNase-free Дезоксирибонуклеаза I (DNase I, EURx Sp., Gdansk, Poland; 1U/ μ l) и 1U/ μ l RNase инхибитор (EURx Sp., Gdansk, Poland) при 37°C за 30 минути. Използван беше DNase I STOP Solution (5 mM EDTA, pH 8.0) за топлинно инактивиране на DNase I на 65°C за 10 минути.

2.11. Синтез на кДНК чрез обратна транскрипция на изолираната тотална РНК

Използвахме NG dART RT-PCR kit (EURx Sp., Gdansk, Poland). Експеримента беше проведен по протокол на производителя, използвани бяха oligo (dT)₂₀ праймери.

2.12. Количествена полимеразна верижна реакция след обратна транскрипция в реално време (real qRT-PCR)

Чрез количествен qRT-PCR в реално време бяха изследвани експресионните нива на гените след добавяне на различни концентрации HRE, както и при допълнително третиране с γ -радиация и H₂O₂ в туморна клетъчна линия HeLa. Беше измерена и експресията на референтния ген *GAPDH*, който използвахме като ендогенна контрола. В Таблица 2 са представени олигонуклеотидните последователности на използваните праймери (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany GmbH)

Таблица 2. Нуклеотидна последователност на олигонуклеотидни праймери

Ген	NCBI Ref Seq	Олигонуклеотидна последователност 5'-3'	Ампликон, б.д.
TP53	NM_000546.5	For_ AACAGCTTTGAGGTGCGTGTGTTGTG	144
		Rev_ AGAGGAGCTGGTGTGTTGGGCA	
ATM	NM_000051.3	For_ TGCTGTGAGAAAACCATGGAAGTGA	137
		Rev_ TCCGGCCTCTGCTGTAAATACAAAG	
BRCA1	NM_007294.3	For_ CACCCAATTGTGGTTGTGCAGC	141
		Rev_ GTCCAGCTCCTGGCACTGGTAGAG	
CDKN1A (p21)	NM_000389.4	For_ AGAGGAAGACCATGTGGACCTGTCA	134
		Rev_ AGAAATCTGTCATGCTGGTCTGCC	
BBC3 (PUMA)	NM_014417.4	For_ GGATGGCGGACGACCTCAA	119
		Rev_ GGGTAAGGGCAGGAGTCCCATG	
RAD50	NM_005732.3	For_ TGGTGATGCTGAAGGGAGACACA	147
		Rev_ TTGTTGGCTCATCCAAGGCAATG	
RAD51	NM_133487.3	For_ TCAAGCATCAGCCATGATGGTAGAA	132
		Rev_ AGAAACCTGGCCAAGTGCATCTG	
GAPDH	NM_002046.5	For_ ACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	136
		Rev_ ACCCTGTTGCTGTAGCCAAATTCTG	

qRT-PCR реакциите бяха осъществени на апарат Rotor-GeneTM 6000 Real-time PCR thermal cycler (Corbett Life Science, Quagen, Venlo, The Netherlands), като бяха използвани китове 2X Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo ScientificTM) и SG qPCR Master Mix (2x)(EURx Sp., Gdansk, Poland) според инструкциите на производителя.

RT qPCR данните бяха анализирани, посредством Rotor-Gene 6000 Software 1.7. За изчисляване на относителната концентрация

(RQ- relative quantification) на генната експресия на пробите беше използвани стойностите Ct (threshold cycle). Бяха приложени два метода за изчисляване на RQ, метода на стандартната крива и делта Ct ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) метод (Livak K.J. and Schmittgen T.D., 2001). Експресията на всеки ген беше анализирана в 3 независими повторения на експеримента.

2.13. Статистически анализ

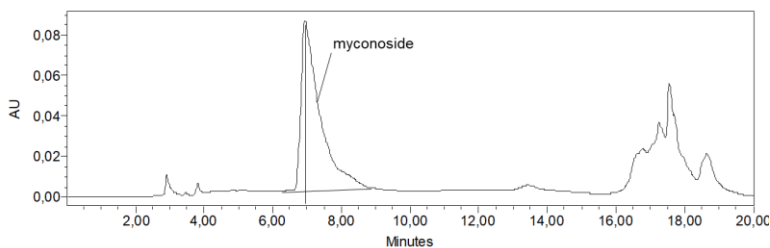
Статистическите анализи бяха извършени със статистическа програма IBM SPSS Statistics (Statistical Package for Social Sciences) версия 19.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Използван беше вариационен анализ, за оценка на разликите между средните стойности с нормално разпределение, като се прилагаше **Student t-test** (two-tailed significance), съответно **paired-sample t-test** за 2 зависимы групи и **independent sample t-test** при две независими групи. Получените стойности са представени като means $\pm$ SD от три повторения, като за статистически значими бяха приети стойности на $p < 0.05$.

Изготвянето на графичните изображения и таблици беше извършено със софтуерни продукти Microsoft Excel 2010 и Microsoft Word 2010 (Microsoft Corp., USA).

РЕЗУЛТАТИ

1. Резултати от високоефективна течна хроматография (HPLC) на тотален екстракт *H. rhodopensis*

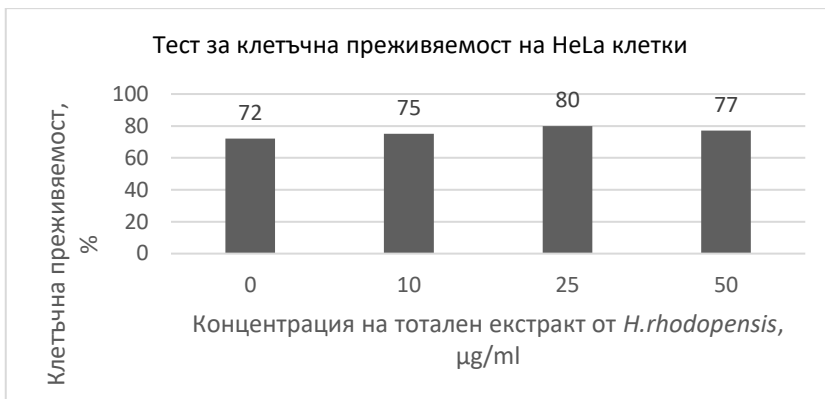
На база информация от предишни изследвания на основните групи вторични метаболити съдържащи се в екстракти от *H. rhodopensis* и определяне на миконазид като една от основните активни съставки на растението, използвания в нашата научна разработка тотален HRE беше изследван с HPLC. Проучването беше насочено към идентифициране и количествено определяне на миконазид. Най-добър ясно отличен пик в хроматограмата посочена на фигура 1 съответства на миконазид, като времето на задържане е 7 минути, а съдържанието му беше определено на 140 ± 2.3 мг/г сухо тегло.



Фиг. 1 HPLC анализ на тотален станолев HRE използван в изследването

2. Резултати от анализа на клетъчната преживяемост на HeLa клетъчна линия след третиране с тотален екстракт *H. rhodopensis*

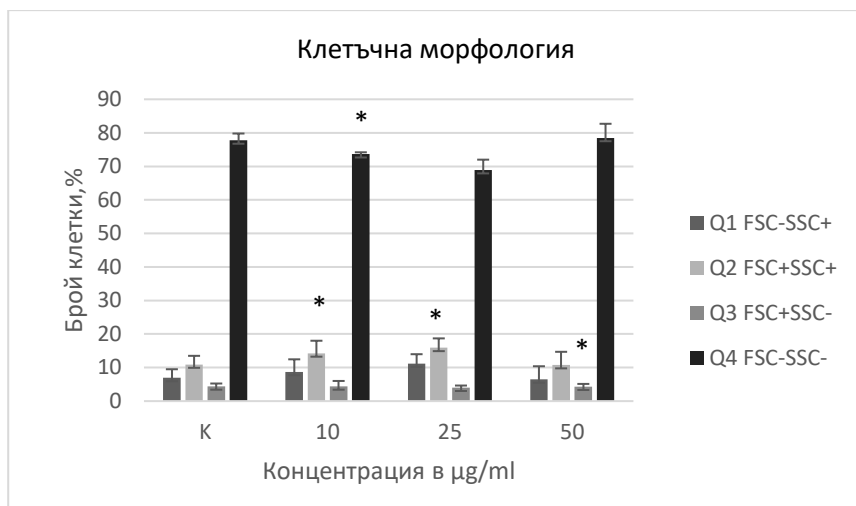
За анализ на клетъчната преживяемост на клетъчна линия HeLa след третиране с различни концентрации на тотален HRE беше проведен тест с трипаново синьо. Експериментът беше извършен 3 часа след добавяне на 10, 25 и 50 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE, като така беше оценен директния токсичен ефект на използваните концентрации за времето на третиране. Изследвана беше и контролна група клетки без добавен екстракт. На фигура 2 са показани получените резултати, като се наблюдава минимално увеличение в процента на жизнени клетки след третиране и с трите изследвани концентрации на тотален HRE в сравнение с контролната група. За 100% се приема изходната концентрация от $1,6 \times 10^6$ клетки/мл във всяка ямка. Отчетеният лек стимулиращ ефект на екстракта не може да се приеме за значителен, но е основание да считаме, че приложените концентрации не предизвикват цитотоксичен ефект върху клетъчна линия HeLa през изследвания период от време.



Фиг. 2 Клетъчна преживяемост след прилагане на 10, 25 и 50 µg/ml тотален HRE върху HeLa клетки

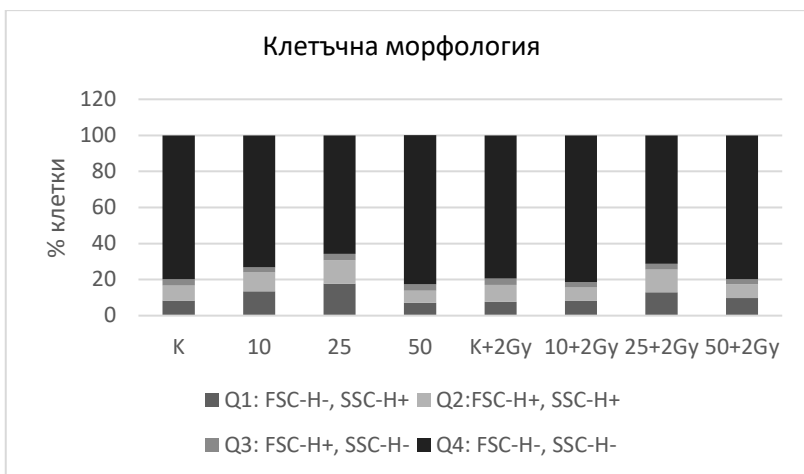
3. Резултати от анализа на клетъчна морфология и разпределение на фазите на клетъчния цикъл на туморна клетъчна линия HeLa, чрез флоуцитометричен анализ.

Флоуцитометричен анализ за оценка на клетъчната морфология на HeLa клетъчна линия беше проведен след третиране с концентрации от 10, 25 и 50 µg/ml тотален HRE в продължение на 3 часа. Разпределение на клетъчната популация беше извършено спрямо параметрите клетъчен размер (FSC-H) и гранулираност (SSC-H). Клетките се разпределят спрямо своите параметри на 4 квадранта съответно: Q1-малки, гранулирани (клетки в състояние на некроза); Q2-големи, гранулирани клетки (късна фаза на апоптоза); Q3-големи, негранулирани клетки (ранна фаза на апоптоза) и Q4 –малки, негранулирани клетки (нормални). Получените резултати посочени на фигура 3 показаха минимално, но статистически значимо ($p < 0.05$) увеличение на клетките в Q2 квадрант (късна апоптоза) при клетките третирани с 10 и 25 µg/ml тотален HRE, както и слабо, но отново със статистическа значимост намаляване на броя клетки в Q4 (нормални) третирани с 10 µg/ml и Q3 (ранна апоптоза) третирани с 50 µg/ml екстракт в сравнение с контролната група клетки.



Фиг. 3. Флоуцитометричен анализ на разпределение на клетъчната популация спрямо клетъчния размер и гранулираност (FSC-H, SSC-H) на HeLa клетъчна линия след третиране с 10, 25 и 50 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE.

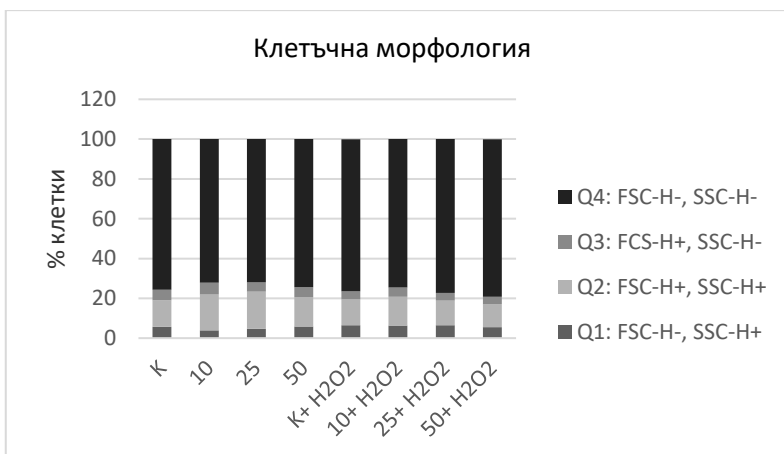
Анализ на клетъчната морфология на туморна клетъчна линия HeLa третирана с концентрации от 10, 25 и 50 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE и контролна не третирана група беше извършена и след облъчването на изследваните клетки с 2 Gy γ -радиация за предизвикване на генотоксичен стрес и анализирана с флоуцитометрия.



Фиг.4. Флуоцитометричен анализ на разпределение на клетъчната популация спрямо клетъчния размер и гранулираност (FSC-H, SSC-H) на HeLa клетъчна линия след третиране с различни концентрации на тотален HRE и последващо облъчване с 2 Gy γ -радиация. Резултатите са представени като процент спрямо нетретираната контрола.

Резултатите, които наблюдаваме на фигура 4 не показаха статистически значими изменения в клетъчната морфология между групите облъчени с 2 Gy γ -радиация след третирането с различните концентрации тотален HRE и в групите третирани само с екстракта. Най-голям процент от клетките остават Q4 квадрант (нормални), като в групите третирани с 10 и 25 $\mu\text{g/ml}$ от екстракта броя на клетките с нормален размер след облъчването беше слабо повишен.

Флуоцитометричен анализ за определяне на клетъчната морфология на HeLa клетъчна линия третирана с концентрации от 10, 25 и 50 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE и контролна не третирана група беше извършен и след предизвикването на оксидативен стрес, като към изследваните групи беше добавен 10 mM H_2O_2 .

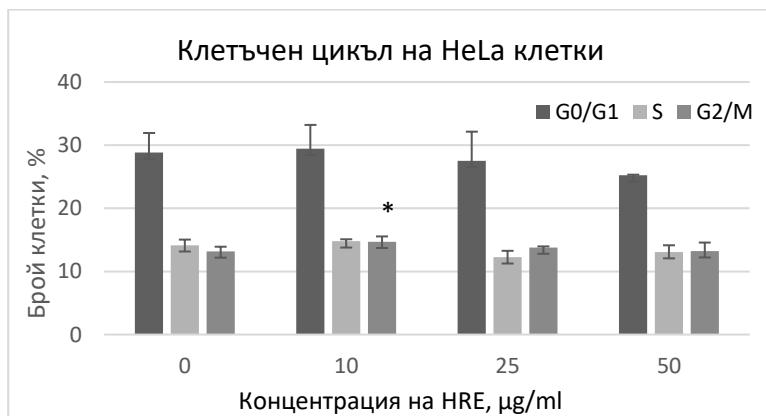


Фиг.5. Флоуцитометричен анализ на разпределението на клетъчната популация спрямо клетъчния размер и гранулираност (FSC-H, SSC-H) на HeLa клетъчна линия след третиране с различни концентрации на HRE и последващо добавяне на 10 mM H₂O₂. Резултатите са представени като процент спрямо нетретираната контрола.

Резултатите са показани на фигура 5, не бяха открити значителни изменения в клетъчната морфология между групите третирани само с тотален HRE и тези подложени на допълнителен оксидативен стрес с добавянето на 10 mM H₂O₂. Сравнителен анализ беше извършен и между контролните групи без добавен екстракт и тези без екстракт, но третирани с 10 mM H₂O₂. Разпределението на клетки в състояние на апоптоза остава приблизително еднакво независимо от приложената концентрация на екстракта. Минимално изменение се наблюдава в разпределението на процента клетки в Q2 (късна апоптоза) и Q4 (нормални) при всички групи третирани с тотален HRE след прилагането на 10 mM H₂O₂. Установи се намаляване на броя клетки в състояние на апоптоза, за сметка на нарастване на процента нормални клетки, но разликата не беше потвърдена статистически.

На фигура 6 е изобразено разпределението на клетките на HeLa клетъчна линия във фазите на клетъчния цикъл спрямо параметъра количество ДНК, което съдържат извършено с флоуцитометричен анализ. Първоначално бяха изследвани контролна група без добавен тотален HRE, като контрола и 3 групи,

които бяха третирани съответно с 10, 25 и 50 $\mu\text{g/ml}$ с тотален HRE за период от 3 часа. Установено беше, че най-голям дял от клетките се намират в G0/G1 фаза на клетъчния цикъл, както в контролната група, така и в останалите 3 изследвани групи. Процентното разпределение, в останалите фази на клетъчния цикъл се запази без резки промени между контролната група и тези третирани с екстракт. Процента клетки във фаза G0/G1 слабо намалява с повишаване на концентрацията на приложени екстракт, но стойностите са в граници които не показват статистическа значимост на наблюдаваната тенденция. Клетките в S фаза на групата с приложен 10 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE се запазват непроменени спрямо контролната група, докато в G2/M фазата на същата група се установи минимално, но статистически значимо повишаване на процента клетки. В групите третирани с 25 и 50 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE се констатираше понижаване на процента клетки в S фаза, докато клетките в G2/M оставаха без промяна спрямо контролната група.



Фиг.6. Клетъчен цикъл на HeLa клетъчна линия, контролна (К) и третирани с различни концентрации на тотален HRE групи за период от 3 часа. Резултатите са представени като процент спрямо нетретираната контрола със съответните SD (* $p < 0.05$ vs K).

За да изследваме дали разпределението във фазите на клетъчния цикъл се променя след допълнително прилагане на генотоксичен стрес, 4 групи клетки включващи контрола и 3 групи предварително третирани с 10, 25 и 50 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE бяха облъчени с 2 Gy γ -радиация. Отново бяха анализирани с

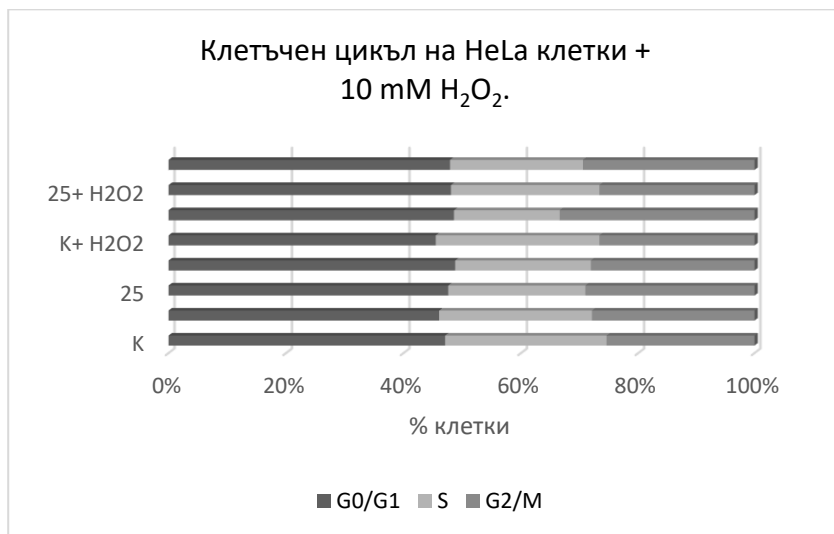
флоуцитометрия и сравнени със съответните групи без облъчване. Резултатите посочени на фигура 7 не показаха съществени разлики в разпределението между фазите в резултат третирането с 2 Gy γ -радиация. Основния процент клетки остават в G0/G1 фаза. Показване на броя клетки в S фаза за сметка на понижения им брой в G0/G1 се наблюдава само в групата третирана с 50 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE спрямо контролната група. Слабо понижаване на количеството клетки в G0/G1 се констатира и при сравняването между еквивалентните две групи, когато са подложени на облъчване с гама радиация, но без да се променя процента клетки в S фаза.



Фиг.7. Клетъчен цикъл на HeLa клетъчна линия, контролна (К) и третирани с различни концентрации на тотален HRE групи и последващо облъчване с 2 Gy γ -радиация. Резултатите са представени като процент спрямо нетретираната контрола.

Експерименталната постановка беше повторена, но като стресов фактор беше използван с 10 mM H_2O_2 , който предизвиква оксидативен стрес в клетките. Сравнени бяха контролните групи без добавен тотален HRE и тези с добавен 10 mM H_2O_2 , както и всяка една от групите HeLa клетъчна линия третирана съответно с 10, 25 и 50 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE и такива с допълнително приложен 10 mM H_2O_2 . Резултатите (фигура 8) показаха, че допълнително предизвикания оксидативен стрес, не променя съществено

разпределението клетките във съответните фази на клетъчния цикъл сравнено с групите клетки, които бяха третирани само с тотален HRE. Въпреки липсата на статистическа значимост беше установено слабо понижаване на процента клетки в G0/G1 фаза при контролата третирана с H_2O_2 спрямо нетретираната. По-малко с приблизително 5% бяха клетките в S фаза в групата третирана с 10 $\mu g/ml$ тотален HRE след прилагането на 10 mM H_2O_2 .



Фиг. 8. Клетъчен цикъл на клетъчна линия, контролна (K) и третирани с различни концентрации на тотален HRE групи с последващо добавяне на 10 mM H_2O_2 . Резултатите са представени като процент спрямо нетретираната контрола

4. Резултати от анализ на ниво генна експресия на гени свързани с репарацията на ДНК и контрола на клетъчния цикъл върху туморна клетъчна линия HeLa, третирана с нарастващи концентрации от тотален HRE.

Приехме генната експресия за значително повишена при стойности на $RQ \geq 2$, а за значително намалена при стойности на $RQ \leq 0.5$ RQ между 0.5 и 1.99 се приемаше за не съществено изменена. За стойност на количеството получен транскрипт на калибратора (не третирана контрола) се приема $RQ=1$

4.1. Резултати от анализ на относителната генната експресия на ниво иРНК на *ATM* ген

ATM генът, кодира протеин от семейството на фосфатидилиинозитол киназите, чиято функция е регулиране на сигналните пътища за контрол на клетъчния цикъл, необходими за осъществяване на клетъчния отговор при ДНК увреждане и геномна нестабилност.



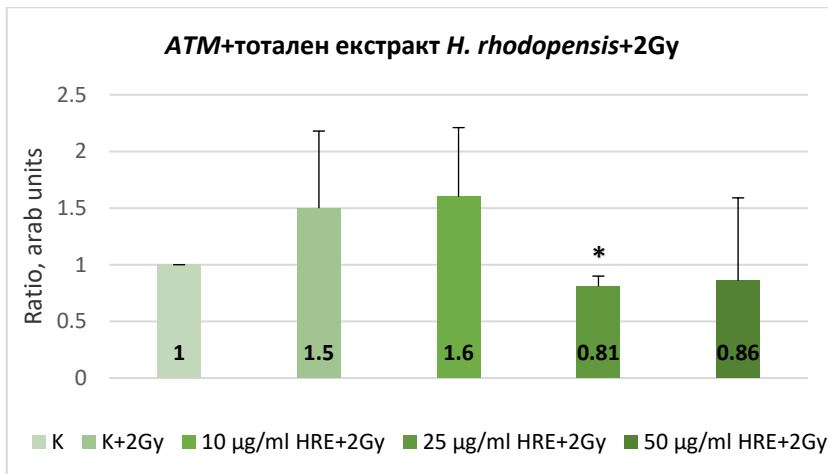
Фиг. 9 Относителна експресия на ген *ATM* в HeLa клетъчна линия след третиране с различни концентрации на total HRE.

За да определим как total HRE повлиява относителната експресия на ген *ATM* в клетъчна линия HeLa, 3 групи клетки бяха третирани с нарастващи концентрации от total HRE, съответно 10 µg/ml, 25 µg/ml и 50 µg/ml за общо 3 часа и 15 мин. Беше изследвана и контролна група без добавен total HRE. В получените резултати от qRT-PCR анализа беше установено, че не се наблюдават съществени

промени в нивата на относителна експресия между контролната група клетки и останалите групи третирани с различни концентрации от total HRE (Фигура 9).

Наблюдава се слабо, незначимо понижаване на експресията на ген *ATM* в клетъчна линия HeLa третирана с 50 µg/ml total HRE в сравнение с нетретираните клетки. Не бяха установени статистически значими разлики между нивото на експресия на контролата и изследваните групи.

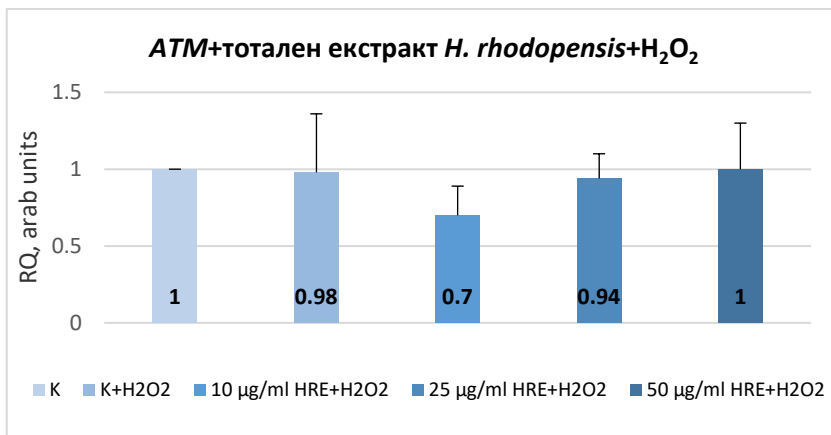
Последваха експерименти за отчитане на промяната в експресията на *ATM* гена в клетъчна линия HeLa след прилагането на генотоксичен стрес върху групата клетки без добавен екстракт и групите предварително третирани със съответните концентрации от тотален HRE. За целта клетките бяха облъчвани с 2 Gy γ -радиация или третирани с 10mM H₂O₂.



Фиг. 10. Относителна експресия на ген *ATM* в HeLa клетъчна линия, контролна (K) и третирани с различни концентрации на тотален HRE групи, с последващо облъчване с 2 Gy γ -радиация (* $p < 0.05$ vs K)

Беше установено повишаване на експресията на *ATM* гена с 50% в контролната група без добавен тотален HRE в резултат на облъчването на клетъчната линия с 2 Gy радиация (фигура 10), като получения резултат не показва статистически значима разлика спрямо контролната група клетки без екстракт и без облъчване. Третирането на клетъчната линия с тотален HRE с концентрация 10 $\mu\text{g/ml}$ преди облъчването води до почти идентични нива на експресия на гена сравнени с облъчената контрола.

При групите клетки третирани с концентрации от 25 $\mu\text{g/ml}$ и 50 $\mu\text{g/ml}$, беше наблюдавано намаляване на експресията на *ATM* гена, като доближава стойностите до контролните нива преди излагането на радиация. Статистическа значима разлика беше установена при групата HeLa клетки третирани с 25 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$) спрямо стресовия фактор γ -радиация.



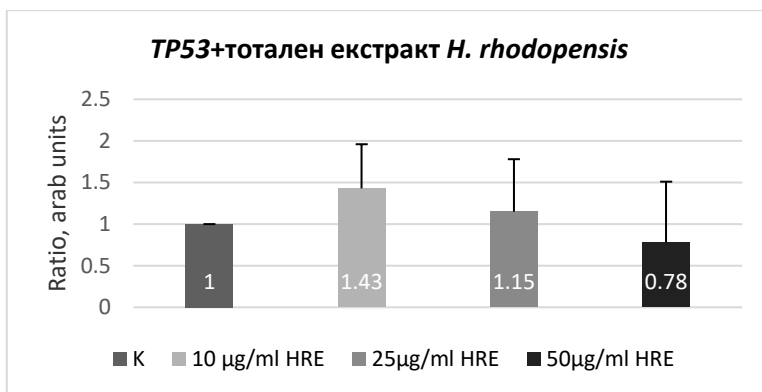
Фиг.11. Относителна експресия на ген *ATM* в HeLa клетъчна линия третирана с различни концентрации на тотален HRE и с добавен 10 mM H_2O_2 .

При третирането на клетъчна линия HeLa с 10 mM H_2O_2 не беше отчетена промяна в експресията на *ATM* гена, спрямо контролната група клетки. Подобни бяха и получените резултати в групите клетки третирана предварително с 3те различни концентрации от тотален HRE (Фигура 11).

Намаляване на експресията на *ATM* гена с 30 %, беше наблюдавана единствено в групата клетки предварително третирана с 10 µg/ml тотален HRE в сравнение с контролната група, но не беше установена статистически значима разлика в получените резултати.

4.2. Резултати от анализ на относителната генната експресия на ниво иРНК на ген *TP53*

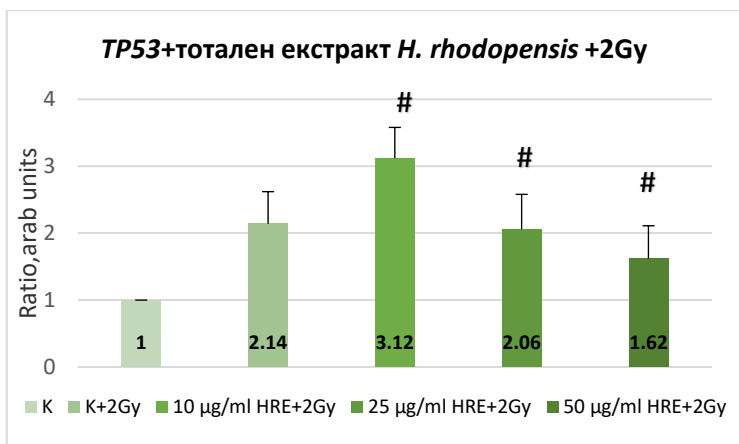
Тумор супресорният ген *TP53*, кодира протеин p53, осъществяващ клетъчния отговор при различни състояния на стрес, регулира клетъчния цикъл, действа като транскрипционен фактор на различни гени, участващи в ДНК репарацията, апоптозата и клетъчния метаболизъм.



Фиг. 12. Относителна експресия на ген *TP53* в HeLa клетъчна линия след третиране с различни концентрации на тотален HRE.

За определяне влиянието на различни концентрации от тотален HRE върху относителната експресия на ген *TP53* в клетъчна линия HeLa бяха сравнени получените RQ стойности в контролна група без добавен екстракт и в 3 експериментални групи третирани съответно с 10, 25 и 50 µg/ml от тотален HRE. Съответно беше установено слабо повишаване на експресията на ген *TP53* в групите третирани с 10 µg/ml (43%) и 25 µg/ml (15%) тотален HRE (Фигура 12) спрямо контролата.

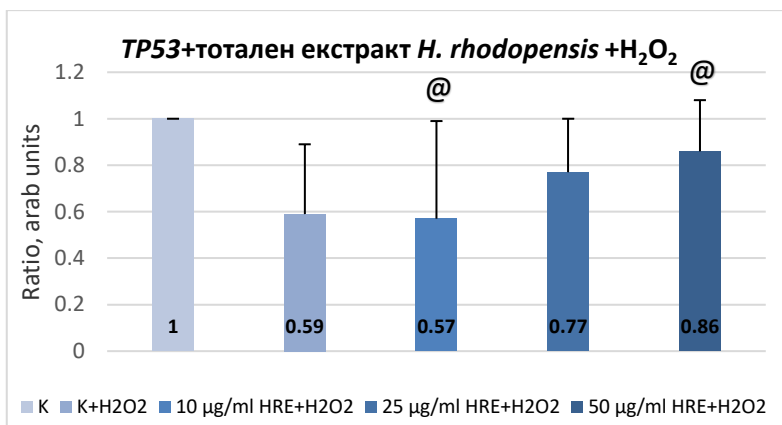
Обратен ефект беше отчетен в групата третирана с 50 µg/ml екстракт, понижаване на експресията с 22%. Въпреки това, RQ стойностите бяха приети за незначителни, тъй като не достигаха 2-кратна промяна.



Фиг.13. Относителна експресия на ген *TP53* в HeLa клетъчна линия, контролна (K) и третирани с различни концентрации на тотален HRE групи, с последващо облъчване с 2 Gy γ -радиация. (# $p < 0.05$ vs K+2Gy).

За нашето проучване контролна и предварително третирани с различни концентрации на тотален HRE групи HeLa клетки бяха подложени на облъчване с 2 Gy γ -радиация. Както е показано на фигура 13, беше наблюдавано двукратно повишаване на транскрипционните нива на гена *TP53* в HeLa клетъчна линия след облъчване. В групата третирана с най-ниската концентрация от 10 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE, беше отчетено продължаващо повишаване на експресията на гена *TP53*, със статистическа значимост ($p < 0.001$), което е в съответствие и с наблюдаваните по-високи стойности на генния продукт в групата и преди облъчването в сравнение с останалите.

Предварителното третиране на HeLa клетъчната линия с концентрации от 25 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE, показва слабо намаляване на относителната концентрация на *TP53* до стойности близки на групата без екстракт ($p < 0.001$), която продължава да намалява и при по-високата концентрацията от 50 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE ($p = 0.017$).



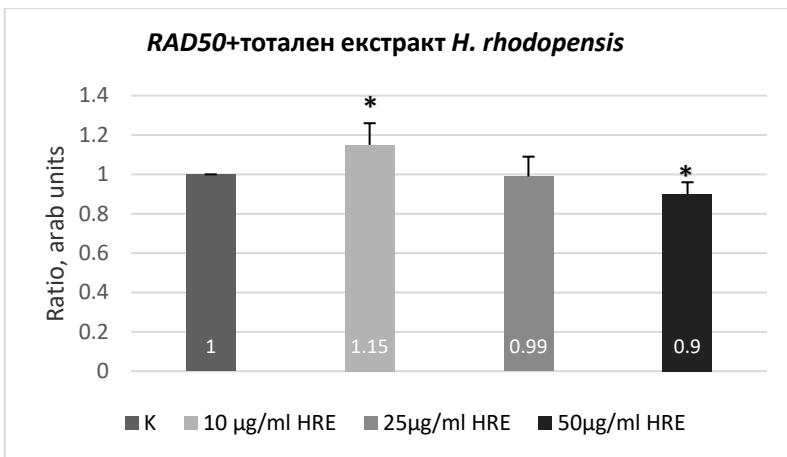
Фиг.14. Относителна експресия на ген *TP53* в HeLa клетъчна линия третирана с различни концентрации на тотален HRE и с добавен 10 mM H_2O_2 . (@ $p < 0.05$ vs проба без H_2O_2).

За да се определи как оксидативният стрес повлиява експресията на ген на *TP53*, към контролна клетъчна линия HeLa и 3 групи клетки третирана с 10, 25 и 50 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE беше добавен 10 mM H_2O_2 . В резултат беше наблюдавано рязко понижаване в нивата на експресия на гена *TP53* в контролната група и постепенно слабо покачване на получените RQ стойности в съответствие с нарастването на концентрацията на тотален HRE (Фигура 14).

Въпреки, че не бяха достигнати двукратни изменения в RQ стойностите, за да ги приемем за значителни, беше установена статистическа значима разлика при концентрации от 10 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE ($p=0.029$) и 50 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE ($p=0.011$) спрямо съответсващата група клетки не третирана с H_2O_2 .

4.3. Резултати от анализ на относителната генната експресия на ниво иРНК на *RAD50* ген

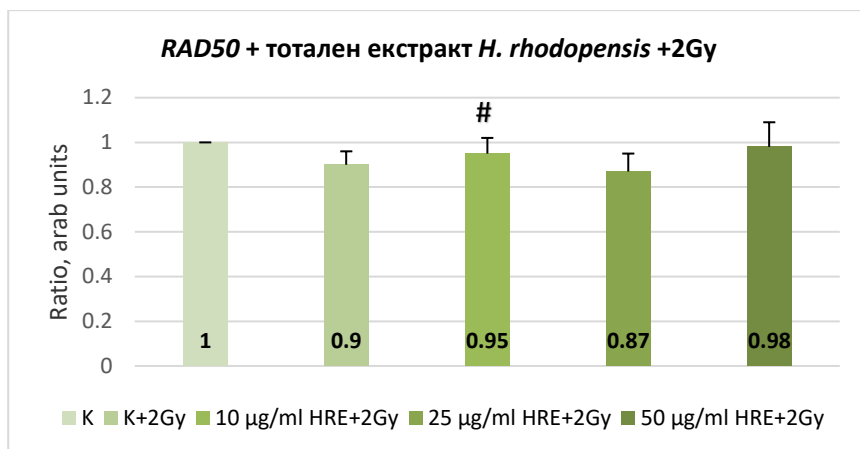
RAD50 е ген, кодиращ протеин с ключова роля в MRN комплекса, един от първите молекулярни сигнали при двойно верижни разкъсвания на ДНК молекулата. Този ген участва в репарацията, контрола на клетъчния цикъл, мейотичната рекомбинация и поддръжката на теломерите.



Фиг. 15. Относителна експресия на ген *RAD50* в HeLa клетъчна линия след третиране с различни концентрации на тотален HRE. (* $p < 0.05$ vs K).

Анализирана беше относителната експресия на ген *RAD50* в клетъчна линия HeLa на контролна група и 3 групи клетки третирани с 10, 25 и 50 µg/ml тотален HRE. Не зависимо от концентрацията на екстракта в първите часове след третиране не се отчитаха значителни промени в RQ на гена (Фигура 15).

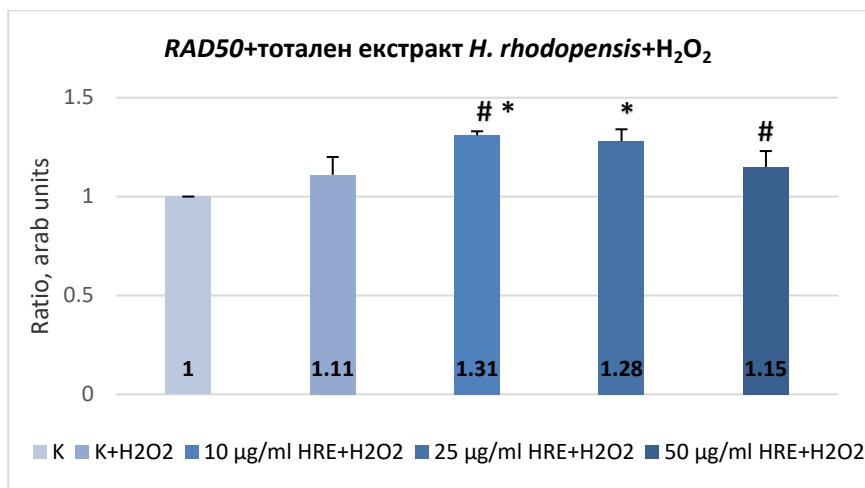
Въпреки това, третираните с 10 µg/ml тотален HRE клетки, показват 15 % увеличение ($p=0.048$) на експресията, а клетките с добавен 50 µg/ml тотален HRE, намаляват експресията на *RAD50* с 10 % ($p=0.015$), като получените резултати показаха статистически значима разлика в сравнение с контролната група.



Фиг. 16. Относителна експресия на ген *RAD50* в HeLa клетъчна линия, контролна (K) и третирана с различни концентрации на тотален HRE групи, с последващо облъчване с 2 Gy γ -радиация. (# $p < 0.05$ vs K+ 2Gy).

Получените резултати показаха, че прилагането на генотоксичен стрес под формата на облъчване с 2 Gy γ -радиация, не повлиява драстично експресията на *RAD50*, както при контролната група, така и при групите HeLa клетки третирана с 3те различни концентрации на тотален HRE. При контролната група без третиране с екстракт беше отчетеното понижаване на експресията с 10% (Фигура 16).

Наблюдава се леко понижаване с 5% на RQ, но със статистическата значимост в групата клетки третирана с 10 µg/ml тотален HRE ($p = 0.049$) спрямо контролата. В останалите групи клетки, независимо от по-високите концентрации на приложения тотален HRE бяха отчетени съвсем слаби промени в RQ стойностите на *RAD50*, но без статистическа значимост.



Фиг. 17. Относителна експресия на ген *RAD50* в HeLa клетъчна линия третирана с различни концентрации на тотален HRE и с добавен 10 mM H₂O₂. (* p<0.05 vs K; # p<0.05 vs K+ H₂O₂).

Беше установено, че оксидативният стрес предизвикан, чрез добавяне на 10 mM H₂O₂, повишава само с 11% експресията на гена *RAD50* в контролната група HeLa клетки. Както е показано на фигура 17, с 31% и 28 % беше съответно нараснала RQ стойността в групите предварително третирана с 10 µg/ml (p<0.01 vs K и p=0.036 vs K+ H₂O₂, съответно) и 25 µg/ml (p=0.013 vs K) тотален HRE, което въпреки статистическата си значимост, не може да се приеме за значителна промяна в стойностите на експресия на *RAD50*.

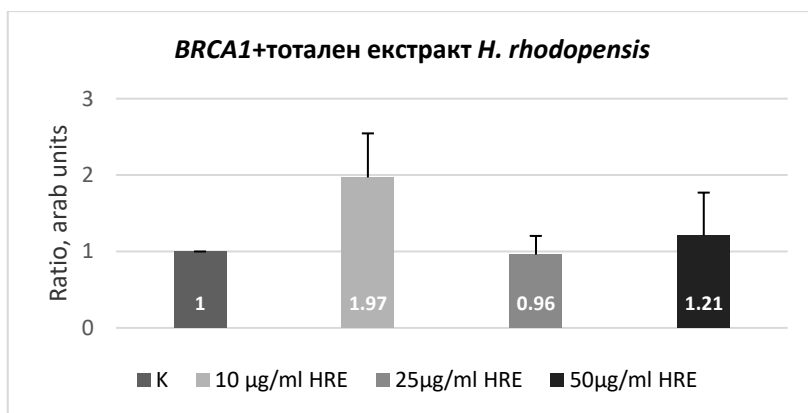
Откри се тенденция (p=0.006) спрямо контролата третирана с H₂O₂ в групата, предварително третирана с най-висока концентрация от екстракта 50 µg/ml тотален HRE, независимо от минималните разлики в стойностите на RQ между двете групи.

4.4. Резултати от анализ на относителната генната експресия на ниво иРНК на *BRCA1* гена

Генният продукт на *BRCA1* участва в процесите на контрол на клетъчния цикъл, репарацията на ДНК, транскрипционна регулация и апоптоза.

След провеждане на изследвания за определяне на влиянието на нарастващи концентрации тотален HRE върху генната експресия

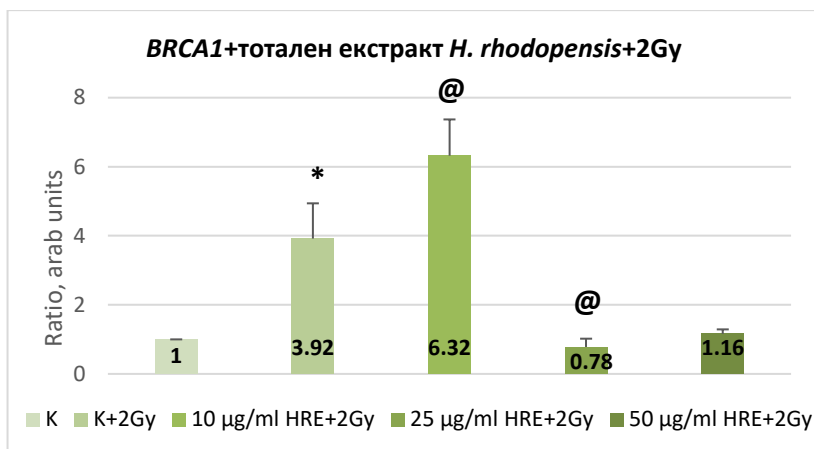
на *BRCA1* в клетъчна линия HeLa в получените данни на фигура 18, беше констатирано значително, почти двукратно повишаване на експресията на *BRCA1* в групата клетки третирани с най-ниската концентрация от 10 $\mu\text{g/ml}$ на изследвания екстракт.



Фиг.18. Относителна експресия на ген *BRCA1* в HeLa клетъчна линия след третиране с различни концентрации на тотален HRE.

Прилагането на по-високи концентрации тотален HRE от 25 $\mu\text{g/ml}$ и 50 $\mu\text{g/ml}$ съответно не показаха значителни изменения в относителната експресия на гена *BRCA1*. В нито една от групите не беше получена и статистически значима разлика спрямо контролната група.

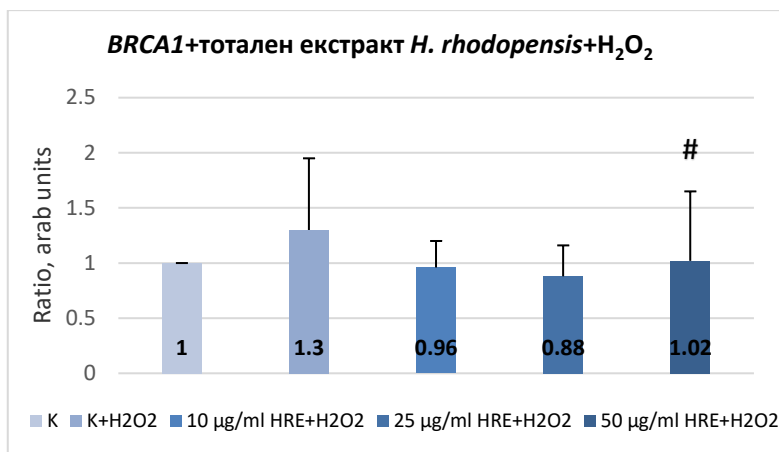
След облъчване на клетъчната линия HeLa с 2 Gy γ -радиация, беше установено, че контролната група клетки повишава почти четирикратно експресията на гена *BRCA1* ($p=0.045$), спрямо не облъчената контрола. При групата клетки HeLa предварително третирани с най-ниска концентрация от 10 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE, беше измерено покачване до стойности на RQ =6.3 пъти ($p=0.012$) за *BRCA1* спрямо същата група клетки преди облъчването, което е в аналогия с получените резултати по-горе (Фигура 19).



Фиг.19. Относителна експресия на ген *BRCA1* в HeLa клетъчна линия, контролна (K) и третирани с различни концентрации на тотален HRE групи, с последващо облъчване с 2 Gy γ -радиация. (* $p < 0.05$ vs K; @ $p < 0.05$ vs проба без 2Gy).

В анализираните данни при прилагането на по-високи концентрации тотален HRE, съответно от 25 $\mu\text{g/ml}$ и 50 $\mu\text{g/ml}$, беше отчетено значително намаляване на експресията на *BRCA1*, до стойности близки да получените в не третираната контролна група. Статистически значима разлика беше наблюдавана и между групите HeLa клетки с добавени 25 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE преди и след облъчването с 2 Gy γ -радиация ($p = 0.029$).

В получените данни от експеримента изследващ експресията на *BRCA1* след предизвикан оксидативен стрес, чрез третиране на групите с 10 mM H_2O_2 не се наблюдаваха значителни промени в RQ стойностите на изследваните групи, каквото беше предизвикано от γ -радиацията. Покачване на експресията с 30% в групата без екстракт и намаляване съответно с 4% и 12% в групите с добавен 10 и 25 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE спрямо не третираната контролна група (Фигура 20) не беше потвърден статистически.

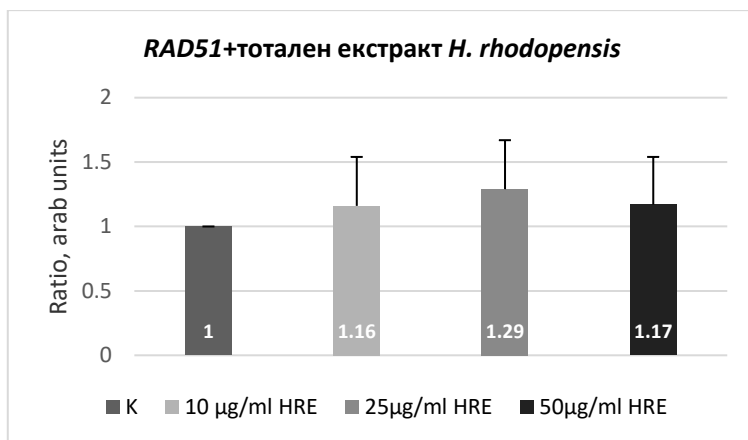


Фиг. 20. Относителна експресия на ген *BRCA1* в HeLa клетъчна линия третирана с различни концентрации на тотален HRE и с добавен 10 mM H_2O_2 . (# $p < 0.05$ vs K+ H_2O_2).

Повишаване на експресията на *BRCA1* при групата клетки с 50 µg/ml тотален HRE и 10 mM H_2O_2 , макар и едва с 2 % беше с потвърдена статистически значима разлика ($p = 0.017$) спрямо контролната група с добавен 10 mM H_2O_2 .

4.5. Резултати от анализ на относителната генната експресия на ниво иРНК на ген *RAD51*

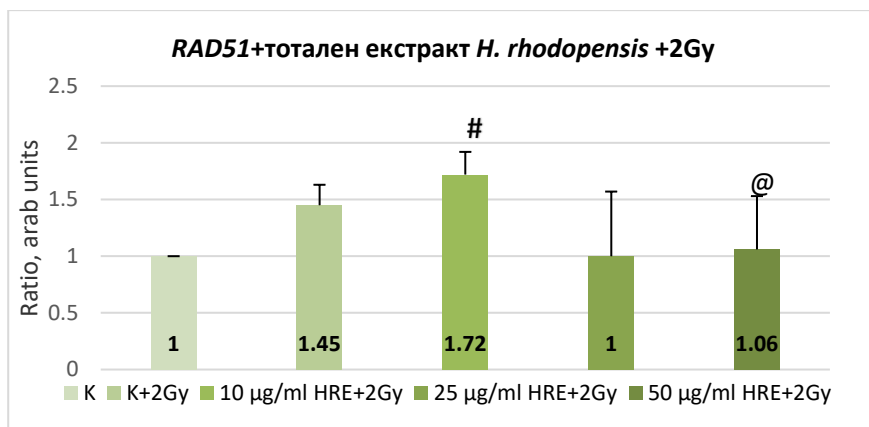
Един от основните гени, участващи в процесите на репарация на двойно верижни разкъсвания на ДНК молекулата е генът *RAD51*. Той има регулаторна функция в процесите на хомоложна рекомбинация, репликационен стрес и мейоза. Беше изследван ефекта на 3-те нарастващи концентрации на тотален HRE в клетъчна линия HeLa върху относителната експресия на генът *RAD51* (Фигура 21).



Фиг.21. Относителна експресия на ген *RAD51* в HeLa клетъчна линия след третиране с различни концентрации на тотален HRE⁴

Не беше отчетена значителна промяна на RQ стойностите при нито една от изследваните групи клетки. Получените резултати оставаха близки до тези на контролната група, която е без добавен екстракт. Установеното нарастване на експресията между 16 и 29% при прилагане на различни концентрации от тотален HRE не беше със статистическа значима разлика спрямо контролата.

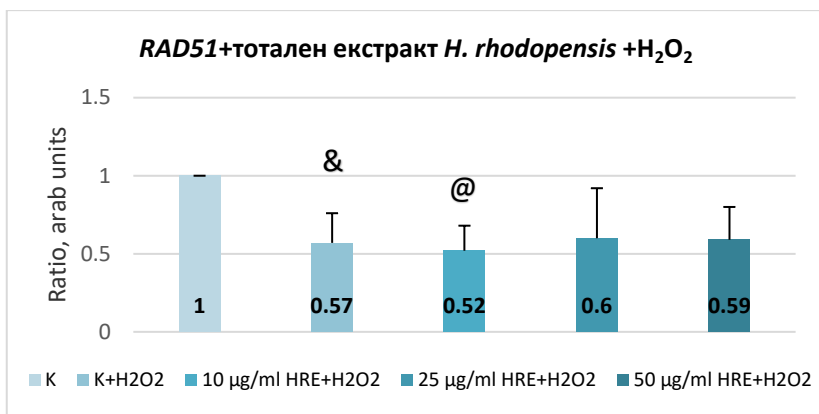
Беше проследена промяната на генната експресия на *RAD51* в контролна група и 3-те групи третирани с 10, 25 и 50 µg/ml тотален HRE след облъчване с 2 Gy γ-радиация. От получените резултати на фигура 22, беше установено 45% повишаване на експресията в контролната група клетки без добавен екстракт. В групата предварително третирана с 10 µg/ml от тотален HRE, беше измерено 1.72 кратно повишаване на експресията, като полученият резултат е със статистически значима разлика ($p=0.016$) спрямо облъчената контролна група клетки.



Фиг. 22. Относителна експресия на ген *RAD51* в HeLa клетъчна линия, контролна (K) и третирана с различни концентрации на тотален HRE групи, с последващо облъчване с 2 Gy γ -радиация. (# $p < 0.05$ vs K+2Gy; @ $p < 0.05$ vs проба без 2 Gy).

В останалите 2 изследвани групи, предварително третирана съответно с 25 и 50 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE, наблюдавахме стойности на RQ равни с експресията в контролната група, преди облъчването, но без статистическа достоверност на резултатите спрямо контролата. При групата третирана с 50 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE нарастването от 6% на експресията показва статистическа разлика ($p = 0.018$) спрямо същата проба преди облъчването с γ -радиация.

Отчетохме ефекта на оксидативния стрес, върху генната експресия на *RAD51*, чрез прибавяне на 10 mM H_2O_2 в изследваната клетъчна линия HeLa, при групата без екстракт и в тези с 10, 25 и 50 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE. Беше установено намаляване на генната експресия на *RAD51* 1.75 пъти ($p = 0.037$) в групата без тотален HRE след добавянето на 10 mM H_2O_2 спрямо не третираната контролна група (Фигура 23).



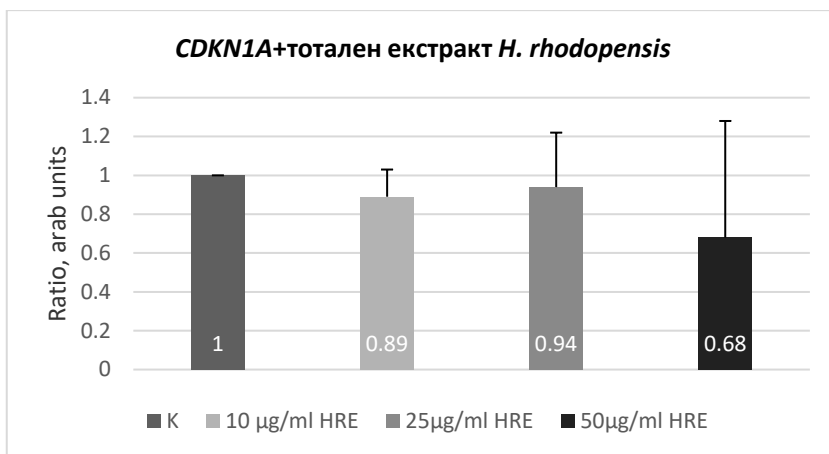
Фиг. 23. Относителна експресия на ген *RAD51* в HeLa клетъчна линия третирана с различни концентрации на тотален HRE и с добавен 10 mM H_2O_2 . (& $p < 0.05$ vs K by Independent T-test; @ $p < 0.05$ проба без H_2O_2).

В групите предварително третирани с нарастващи концентрации на тотален HRE не бяха измерени RQ стойности на *RAD51* над 2 пъти спрямо третираната с 10 mM H_2O_2 контролна група, но беше установена статистически значима разлика между RQ на групата третирана с 10 µg/ml тотален HRE ($p = 0.003$) и преди и след третиране с H_2O_2 .

4.6. Резултати от анализа на относителната генната експресия на ниво иРНК на ген *CDKN1A*

CDKN1A генът кодира протеин p21, който е мощен инхибитор на циклин зависимата киназа. p21 функционира като регулатор на клетъчния цикъл, като експресията му е строго контролирана от тумор супресорния протеин p53.

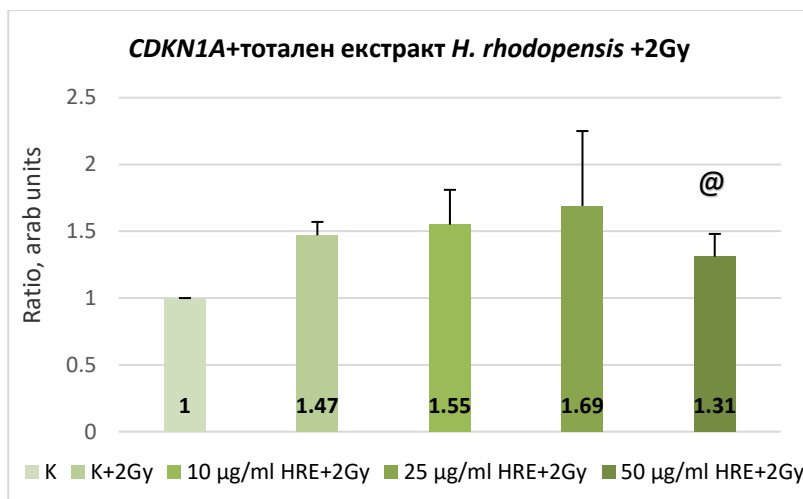
Бяха проведени експерименти за определяне влиянието на 10, 25 и 50 µg/ml от тотален HRE върху експресията на *CDKN1A* гена в клетъчна линия HeLa. В получените резултати беше наблюдавано слабо понижаване на RQ стойностите на p21 и в трите изследвани групи от 11 до 32% спрямо контролата, но не в достатъчна степен, за да се приемат за значителни (Фигура 24).



Фиг.24. Относителна експресия на ген *CDKN1A* в HeLa клетъчна линия след третиране с различни концентрации на тотален HRE.

Най-голям процент разлика се наблюдаваше в групата третирана с 50 µg/ml от тотален HRE спрямо контролата, но различията не се потвърдиха статистически.

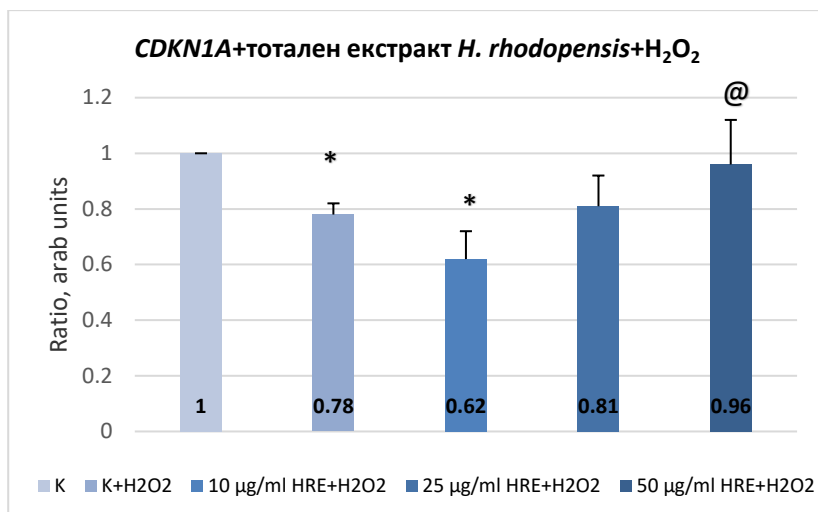
Бяха анализирани резултатите получени след облъчване на клетъчна линия HeLa без добавен екстракт и с 3-те изследвани концентрации на тотален HRE. Наблюдавано беше повишаване с 47% на относителната експресия на *CDKN1A* мРНК в групата без екстракт в сравнение с не облъчената контрола (Фигура 25). Предварително третираните групи на клетъчната линия с 10 и 25 µg/ml тотален HRE показаха продължаващо, макар и не значително нарастване на RQ стойностите на *CDKN1A*.



Фиг. 25. Относителна експресия на ген *CDKN1A* в HeLa клетъчна линия, контролна (K) и третирани с различни концентрации на тотален HRE групи, с последващо облъчване с 2 Gy γ -радиация (@ $p < 0.05$ проба без 2Gy).

В групата с 50 $\mu\text{g/ml}$ от тотален HRE отчетохме тенденция на понижаване на генната експресия доближаваща се до тази на не третираната контролна група, като беше установена статистически значима ($p=0.024$) разлика спрямо същата група преди облъчване с 2 Gy γ -радиация.

Беше отчетен ефекта на 10 mM H_2O_2 върху *CDKN1A* в клетъчната линия HeLa, както в група без добавен тотален HRE така и в останалите групи третирани съответно с 10, 25 и 50 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE. Резултатите показаха, че 10 mM H_2O_2 предизвиква намаляване на експресията на мРНК на p21 с 22% ($p=0.005$) в групата без добавен екстракт спрямо контролата показано на фигура 26.



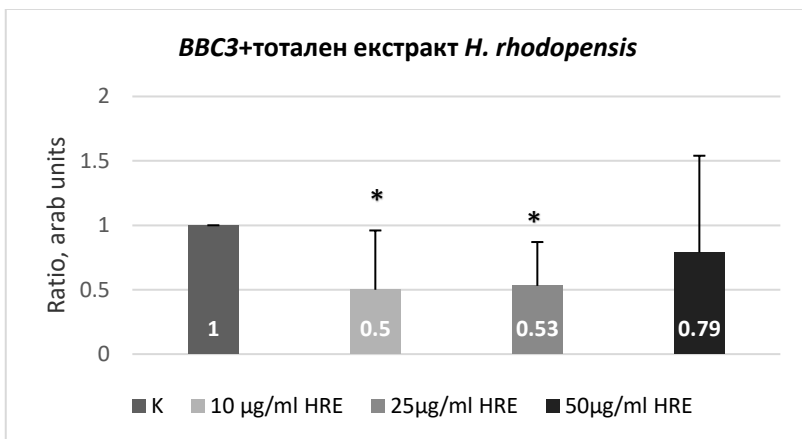
Фиг. 26. Относителна експресия на ген *CDKN1A* в HeLa клетъчна линия третирана с различни концентрации на тотален HRE и с добавен 10 mM H_2O_2 (* $p < 0.05$ vs K; @ $p < 0.05$ vs проба без H_2O_2).

Констатирано беше продължаващо намаляване на RQ стойностите в групата предварително третирана с 10 µg/ml от тотален HRE ($p = 0.009$) спрямо контролната група. Наблюдаваните промени въпреки, че не достигат двукратно изменение на RQ са със статистическа значимост. С повишаване на концентрацията на екстракта беше забелязано повишаване на относителната експресия на гена кодиращ p21, като в групата предварително третирана с 50 µg/ml тотален HRE стойностите бяха нормализирани до тези в контролната група клетки, като данните бяха със статистически значима разлика ($p < 0.001$) спрямо групата преди добавяне на 10 mM H_2O_2 .

4.7. Резултати анализиращи експресията на човешкия *BBC3* ген, кодиращ протеин PUMA (p53-up-regulated modulator of apoptosis).

Про-апонтичният Bcl-2 свързващ компонент 3 (BBC3) ген, е ключов ген от семейството на Bcl-2 протеините. Неговият генен продукт PUMA участва в голям брой физиологични и патологични процеси, като имуен отговор, туморогенеза и различни инфекции, апоптоза и други.

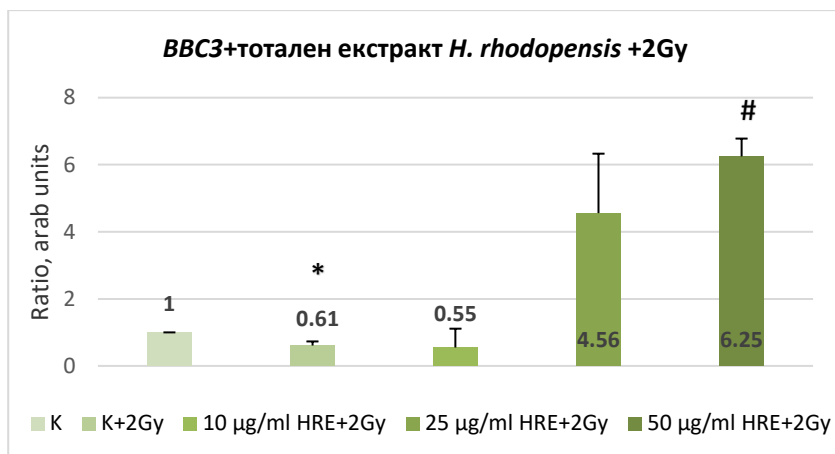
Беше проследен ефекта на 10, 25 и 50 $\mu\text{g/ml}$ totalen HRE в клетъчна линия HeLa върху относителната експресия на *BBC3* гена (Фигура 27). Получените данни показаха значително двукратно понижаване на експресията в групата третирана с 10 $\mu\text{g/ml}$ ($\text{RQ}=0.5$) и с 25 $\mu\text{g/ml}$ ($\text{RQ}=0.53$) totalen HRE, като посочените резултати бяха статистически значими в сравнение с контролната група ($p=0.041$ и $p=0.021$, съответно).



Фиг.27. Относителна експресия на ген *BBC3* в HeLa клетъчна линия след третиране с различни концентрации на totalen HRE. (* $p<0.05$ vs K).

При групата третирана с 50 $\mu\text{g/ml}$ totalen HRE беше наблюдава тенденция за понижена експресия, но $\text{RQ}=0.79$ беше прието за несъществено и не беше установена статистически значима разлика с контролната група.

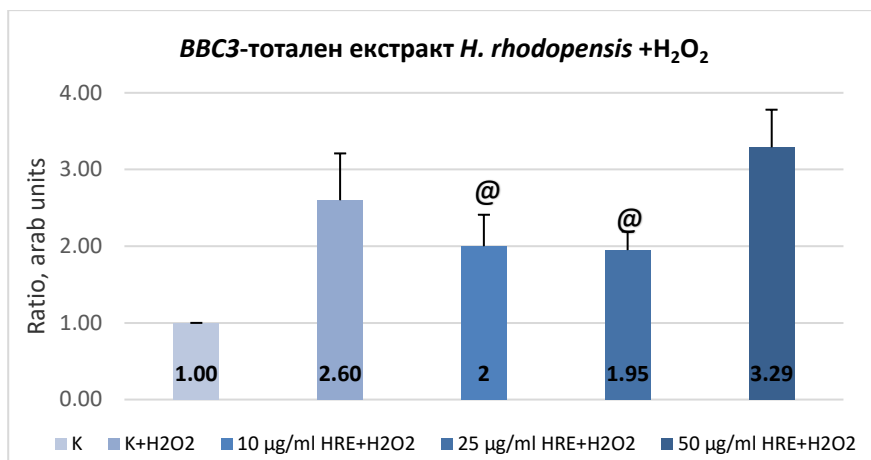
Беше отчетено и влиянието на 10, 25 и 50 $\mu\text{g/ml}$ totalen HRE върху *BBC3* гена в HeLa клетъчна линия, допълнително подложена на облъчване 2 Gy γ -радиация и сравнено с експресията на *BBC3* с контролни групи без екстракт с и без облъчване с радиация. Беше установено, че 2 Gy γ -радиация предизвикват понижаване с близо 40% на относителната експресия на *BBC3* ($\text{RQ}=0.61$) със статистическа значимост ($p=0.037$) спрямо контролната група без облъчване. В групата предварително третирана с 10 $\mu\text{g/ml}$ от totalen HRE останаха запазени ниските стойности на $\text{RQ}=0.55$ без да могат да се приемат за значително изменение (Фигура 28).



Фиг. 28. Относителна експресия на ген *BBC3* в HeLa клетъчна линия, контролна (K) и третирани с различни концентрации на тотален HRE групи, с последващо облъчване с 2 Gy γ -радиация (* $p < 0.05$ vs K; # $p < 0.05$ vs K+2Gy)

За разлика от нея в останалите две групи с 25 $\mu\text{g/ml}$ и 50 $\mu\text{g/ml}$ от екстракта беше наблюдавано рязко повишаване на експресията на *BBC3* до значителните стойности от $RQ=4.56$ при група 25 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE, и повече от 6 пъти в групата с добавен 50 $\mu\text{g/ml}$ екстракт. Значителната разлика между групата с 50 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE и облъчена контролна група беше потвърдена и статистически ($p=0.020$).

Беше изследвано и влиянието на 10 mM H_2O_2 предизвикващ оксидативен стрес върху експресията на *BBC3* гена в клетъчната линия HeLa в групи без и със добавен 10, 25 и 50 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE. В групата без предварително добавен екстракт беше измерено $RQ=2.6$, което приемахме за значително повишаване на експресията на гена. В първите две изследвани групи клетки с тотален HRE, беше измерено слабо понижаване на експресията в сравнение с групата без екстракт, въпреки това $RQ=2$ за групата с 10 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE ($p=0.022$), и $RQ=1.95$ при групата третирана с 25 $\mu\text{g/ml}$ от тотален HRE ($p=0.013$) бяха със статистически значима разлика в стойностите сравнени съответната им проба преди третиране с 10 mM H_2O_2 (Фигура 29).



Фиг. 29. Относителна експресия на ген *BBC3* в HeLa клетъчна линия третирана с различни концентрации на тотален HRE и с добавен 10 mM H_2O_2 (@ $p < 0.05$ vs проба без H_2O_2).

При последната група с 50 µg/ml тотален HRE беше отчетено повече от 3 кратно увеличавана на относителната експресия на *BBC3*, но не открихме статистическо потвърждение на получените резултати.

ДИСКУСИЯ

1.Ефект на тотален HRE върху клетъчната преживяемост, морфология и прогрес на клетъчния цикъл на HeLa клетъчна линия при генотоксичен и оксидативен стрес.

За да определим клетъчната преживяемост на HeLa клетъчна линия под влияние на различни концентрации от HRE беше проведен тест с трипаново синьо. При нито една от изследваните концентрации не се установи значително изменение в преживяемостта на клетките в сравнение с контролната група без добавен екстракт(Фиг.2). Въпреки че, проведеното изследване отчита ефекта на HRE върху HeLa клетки за кратък период от време, то съответства на получените резултати проведени с HRE за 72 часа върху MDA-MB-231(рак на гърдата) и HL-60 (остра миелоидна левкемия) клетъчни линии. Установено, че концентрации до 50 µg/ml метанолов екстракт на *H. rhodopensis* нямат значим цитотоксичен ефект върху съответните клетъчни линии (Berkov

S.H. et al., 2011). Подобни са и резултатите на изследователска група използвала MDA-MB-231, MCF7 (рак на гърда) и MCF-10A (нормални клетки) клетъчни линии, при които концентрации до 300 $\mu\text{g/ml}$ метанолов екстракт от *H. rhodopensis* не променят жизнеспособността на клетките за първите 48 часа (Zasheva, D. et al., 2023). Използваният от нас екстракт съдържа 140 ± 2.3 мг/г миконазид (фиг.1), приложените концентрации са до 50 $\mu\text{g/ml}$ екстракт, предвид времето на третиране липсата на цитотоксичност, която установяваме съответства на получената от Peeva и колектив (2024).

За да се провери влиянието на HRE в различни концентрации върху клетъчната морфология на HeLa клетъчна линия беше проведен флоуцитометричен анализ на описаната опитна постановка по групи. Най- голям е броя на клетките които са в Q4 квадрант(Фиг.3), съответно FSC-H-, SSC-H-(нормални) това показва сравнително еднородна популация клетки, тенденцията се запазва и в групите третирани с различни концентрации HRE.

Проведени бяха и флоуцитометрични анализи на експерименталните групи клетки под въздействието на генотоксичен стрес. Получените данни (Фиг.4) показаха запазено относителното разпределение на клетките главно в Q4, независимо от приложената ЙР във всички изследвани групи. Прилагането H_2O_2 , като източник на генотоксичен стрес при същите експериментални условия, не доведе до значителна промяна в промяна в клетъчната морфология (Фиг.5). Основната популация клетки се запазва в Q4 квадрант. Еднотипно разпределение на клетките в основно една обособена група се потвърждава от експерименти с HeLa клетъчна линия и от други автори (Al Shammari et al., 2025) с преобладаващ брой на нормални клетки.

Основната група клетки в популацията остават във фаза G0/G1, което е характерно за клетъчната линия за времеви период от 3 до 11 часа след посаяката им (Posakony JW et al., 1977). Третирането с нарастващи концентрации на HRE не променя съществено разпределението на клетките HeLa в различните фази на клетъчния цикъл спрямо контролната група.. Подобни резултати, са наблюдавани в HeLa клетъчна линия при третиране с халкон L1 (Kuruc, t. et al., 2021) и хесперидин (Wang, Y. et al., 2015) след 24 часа третиране.

Разпределението на фазите на клетъчния цикъл при HeLa клетъчна линия изложена на облъчване с 2 Gy радиация, както и на трите групи предварително третирани с 10, 25 и 50 $\mu\text{g/ml}$ HRE, показаха резултати съответстващи с наблюдаваните по-горе (Фиг.7). Основната група клетки остават във фаза G0/G1 без значителни разлики в разпределението между отделните групи. Съществуват литературни данни за ефекта на облъчване с 2 Gy върху клетъчна линия HeLa, който увеличава броя на клетките в G2/M фаза, но той е регистриран от 6 до 12 часа след облъчването (Zhao, H. et al., 2019). В проведения от нас експеримент, резултатите се отчитат час след облъчването, така че получените резултати отговарят на очакваната тенденция.

Изследвахме ефекта на 10mM H_2O_2 за 30 мин. върху разпределението на фазите на клетъчния цикъл в контролна група без екстракт и в трите групи предварително третирани с 10, 25 и 50 $\mu\text{g/ml}$ HRE. В получените от нас резултати (Фиг.8) не бяха наблюдавани значими промени между разпределението на клетките HeLa в контролната и останалите групи и най-голям беше броя на клетките във фаза G0/G1. Съществуващите литературни данни показват, че подобно разпределение в клетъчния цикъл на HeLa клетъчна линия се наблюдава при третиране с 100 μM H_2O_2 , проследени за период до 24 часа (Park, WH, 2013).

Във връзка с установените защитни свойства на растителните екстракти спрямо радиация и оксидативен стрес ние се насочихме към определяне на количествените изменения на ключови гени под влиянието на HRE.

2. Анализ на относителната генна експресия на гени кодиращи сензори на увреждане на ДНК-ATM и TP53 под влияние на тотален HRE самостоятелно и при генотоксичен и оксидативен стрес

2.1. ATM

Проучвания на различни растителни екстракти в търсене на противотуморните им свойства предоставя резултати за промените, които настъпват в експресията на ATM гена в туморни клетъчни линии. Очакван е ефекта на повишаване на експресията на ATM в случай на възникване на увреждане на ДНК. Доказано е, че метанолов екстракт от листа на медицинското растение *Citrullus colocynthis* приложен върху MCF-7 клетъчна линия (рак на гърдата) води до повишаване в експресията на ATM гена, при всички

изследвани концентрации (Perveen, S. et al. 2021) за времеви период от 24 до 72 часа, като в резултат се активира ATM/CHK2/p53 пътя за инхибиране на клетъчния цикъл. В проведения от нас експеримент не бяха отчетени значими изменения в транскрипционните нива на *ATM* в клетъчна линия HeLa при нито една от приложените концентрации на HRE (фиг.9), като резултатите могат да се приемат за индикативни, че растителният екстракт не повлиява краткосрочната експресия на *ATM*.

Прилагането на 2 Gy радиация върху контролна група клетки HeLa и групите предварително третирани с нарастващи концентрации от HRE показаха разлика в отчетените експресионните нива на *ATM* (фиг.10). Контролната група клетки, без екстракт които бяха подложени на облъчване повишиха с 50% експресията на *ATM* (RQ=1.5), което макар да не може да се приеме за значителна промяна е в съответствие с резултати и при други автори (Chen T. et al. 2012). Предварителната инкубация на клетъчната линия HeLa с 10 µg/ml HRE, не показва промяна в експресионните нива на *ATM* и бяха приблизително равни с отчетените стойности при облъчената контрола.(RQ=1.6). Повишените нива на експресия на *ATM*, като резултат на облъчване се свързват с повишаване ефективността на клетките за възстановяване на двойноверижни разкъсвания в ДНК, за избягване на апоптозата,като така намаляват чувствителността на раковите клетки към лъчетерапията (Bian L et al., 2020). Тези данни дават възможност да предположим, че по-високите приложени дози от HRE (25 и 50 µg/ml) намаляват ефекта на реакция спрямо DDR възникналите увреждания.

При активиране от ROS, ATM регулира многобройни низходящи пътища, като контролни точки на клетъчния цикъл (Guo Z. et. al., 2010/1) и ROS- зависима автофагия (Lee J. H. et al., 2020), променя и нивата на ROS, чрез възходящи пътища, генериращи редуцирана форма на NADPH (Cosentino C. et al., 2011). Установено е, че дефицит по ATM е свързан с нарушаване на отговора на митохондриите към оксидативен стрес, но механизма на окислително активиране все още не е напълно изяснен (Howes Anna C. et al., 2023).

При сравняване на генната експресия на *ATM* в контролна група HeLa клетки и група третирана с 10 mM H₂O₂ не бяха отчетени изменения в измерените стойности (фиг.11).

Разликите в експресията на *ATM* в клетъчна линия HeLa при изследваните концентрации на HRE в зависимост от вида на генотоксичния стрес, който е приложен са показателни за разликите в механизма на активиране на *ATM*. Гама радиацията е причина за възникване на двойноверижни разкъсвания в ДНК, а оксидативния стрес предизвикан чрез директно въздействие с H_2O_2 активира системата от антиоксидантни ензими.

2.2 TP53

Проучвания на семейството на p-53 тумор супресорни протеини са едни от най-обещаващите в областта на онкологичните изследвания. p53 участва в редица антитуморни механизми, включително предизвиква спиране на клетъчния цикъл, стареене, апоптоза и намаляване на пролиферативните сигнали. Активирането му от много стресови стимули предизвиква стартиране на изключително сложна транскрипционна програма, която влияе върху значителен набор от биологични реакции (Kastenhuber ER & Lowe SW., 2017. Екстракт от растението *Gonolobus condurango* се използва в традиционната медицина, като противораково лекарство. Изследвания с екстракт от растението върху HeLa клетъчна линия, показват повишена експресия на *TP53*, увеличено количество ROS и апоптоза на клетките 9-12 часа след третиране (Bishayee, K et. al., 2013). Според авторите, растителния екстракт инициира генериране на ROS, насърчавайки повишена регулация на експресията на *TP53* водещи до апоптоза, свързана с увреждането на ДНК.

В нашето проучване стойностите на генната експресия на *TP53* под влияние на 3 различни концентрации HRE не провокираха значителни изменения в относителната концентрация на мРНК транскрибирана от *TP53* гена в сравнение с контролната група, която не е третирана с екстракт, тъй като останаха по-малки от 2кратното изменение на RQ (Фиг.12). Въпреки констатираните минимални разлики от така получените резултати можем да съдим, че за проследения интервал от време, растителният екстракт сам по себе си не повлиява съществено експресията на *TP53*.

В нашето изследване въздействието на 2 Gy ЙР, върху експерименталните групи на HeLa клетъчна линия предварително третирани с 3 различни концентрации на тотален HRE и в контролна група показва очакваното значително повишаване на генната експресия на *TP53* (Фиг.13). В контролната група (2Gy+) отчетохме

двукратно повишаване ($RQ=2.14$) на транскрипционните нива на гена в сравнение с групата клетки без облъчване ($2Gy^-$). В групата третирана с $10 \mu g/m$ тотален HRE се отчете продължаващо нарастване на експресията ($RQ=3.12$) на *TP53*, като получените резултати са със статистическа значимост ($p<0.001$) спрямо облъчената контрола ($2Gy^+$) и в съответствие с наблюдаваната по-висока експресия в същата група и преди третирането с γ -радиация. Установихме, че с увеличаване концентрацията на екстракта експресията на *TP53* намалява. Ефекта на понижаване на *TP53* транскрипта най-вероятно е резултат от потискане на радиационно индуцирано ДНК увреждането в пре-инкубираните с тотален HRE клетки (Popov B., et al. 2010a; Georgieva S. et al., 2013a; Popov B. et al., 2013).

За сравнение между стойностите на генна експресия на *TP53* при предизвикан оксидативен стрес съпоставихме относителните концентрации на гена между контролните групи ($-/+ 10 mM H_2O_2$) и тези предварително третирани с трите концентрации на тотален HRE. В контролната група след третиране с H_2O_2 се установи почти двукратно намаляване на експресията ($RQ=0.59$) в сравнение с групата без H_2O_2 (Фиг.14). Анализирайки транскрипционните нива на *TP53* в групите с предварително добавен тотален HRE се отчете концентрационно зависимо нарастване на експресията на гена, като в групата с най-висока концентрация на екстракта- $50 \mu g/ml$, тя се доближава до стойностите преди прилагането на оксидативен стрес ($RQ=0.86$).

Транскрипционния фактор p53 е ключов регулатор в отговора на клетите към стрес, като йонизираща радиация, оксидативен и генотоксичен стрес. По средство активиране на различни нисходящи пътища p53 може да насочи клетките към арест на клетъчния цикъл, апоптоза или стареене (Li.C et al., 2024). Така получените резултати ни дават основание да предположим, че третирането с тотален HRE модулира експресията на *TP53* мРНК в HeLa клетки подложени на оксидативен стрес. Този ефект може да се обясни с богатството на екстракта на множество биологично активни съставки като полифеноли, полизахариди, витамини и други.

3.Анализ на относителната генна експресия на гени свързани с репарацията на ДНК- *RAD50*, *RAD51*, *BRCA1* под влияние на

тотален HRE самостоятелно и при генотоксичен и оксидативен стрес

3.1. RAD50

Rad50 е част от Mre11-Rad50-Nbs1(MRN) комплекс,който играе важна роля в сигналната трансдукция, свързана с възстановяването на ДНК от DSBs, ДНК рекомбинацията и контролните точки на клетъчния цикъл (Kuroda S. et al., 2012).

Разгледан беше ефекта на тотален HRE върху транскрипционните нива на *RAD50* гена при клетъчна линия HeLa. За отчетения период не бяха установени значителни промени в експресията на гена при нито една от трите използвани концентрации (фиг.15). Слабо повишената експресия на *RAD50* при ниски дози на екстракта, предполага вероятно индуциране на нисък брой DSB, и по-скоро неутрален ефект върху ДНК молекулата с повишаване на дозата от екстракта.

Използването на гама радиация като стрес-индуциращ фактор при клетъчна линия HeLa не повлия сравнителната генна експресия на *RAD50* гена значително за проследения период от време. Подобни са и резултатите получени в групите предварително третирани с различни концентрации тотален HRE. Резултатите са в съответствие с по-високите стойности на *RAD50* и преди прилагането на гама радиация. Бихме могли да предположим, че е възможна връзка между периода на отчитане на транскрипционните нива, след облъчване с 2 Gy и получените резултати.

Прилагането на H_2O_2 , за проследяване ефекта на оксидативния стрес върху генната експресия на *RAD50* при клетъчна линия HeLa също не доведе до значителни изменения в сравнение с не третираната група, макар да отчетохме слабо покачване на мРНК.

Група други автори изследващи една от активните съставки на прополиса- фенилов естер на кафеената киселина, са установили ,че прилагането и върху клетки РСa (рак на простатата) и въздействие с ЙР, води до намалена експресия на *RAD50* и *RAD51* свързано с засилено увреждане на ДНК и клетъчна смърт, проявявайки двойна роля на радиопротектор и радиосенсибилизатор (Anjaly, K., & Tik, A. B. 2022.).

3.2 BRCA1

Протеина синтезиран от тумор супресорния *BRCA1* ген е ключов регулатор в основните пътища за поправка на

двойноверижни разкъсвания на ДНК, чрез HR и NHEJ, поддържайки геномната цялост. Участва още в прогресията на клетъчния цикъл, checkpoint регулацията при ДНК увреждане, регулирането на набор от специфични транскрипционни пътища и апоптоза (Wu J. et al.,2010).

Третирането на HeLa клетъчна линия с нарастващи концентрации на тотален HRE, показва повишаване на генната експресия до почти двукратна стойност единствено в групата третирана с най-ниската концентрация от 10 µg/ml екстракта, въпреки голямата разлика с не третирания контрола (RQ=1.97), тя не бе потвърдена статистически (фиг.18). По-високите дози от тотален HRE не промениха значително генната експресия. Поради съществената роля BRCA1 в репарацията на DSBs и по-високите стойности на транскрибирания продукт на гена под въздействието на 10 µg/ml екстракт можем да предположим вероятното възникване на двойно-верижни разкъсвания под влияние на приложената концентрация от екстракта.

Промяната в експресията на *BRCA1* гена след прилагане на 2Gy γ-радиация в клетъчна линия HeLa, която наблюдавахме достигна до значително, почти четирикратно изменение (RQ=3.92) спрямо контролната, не облъчвана група (фиг.19), като разликата беше потвърдена статистически ($p<0.05$). Подобна свръх експресия на *BRCA1* в отговор приложени нарастващи дози γ-радиация е наблюдавана и при MCF-7 клетки, като авторите посочват, че повишената експресия е необходима за спиране на клетъчния цикъл в G2-M фаза и ATM- медирирани сигнални събития надолу по веригата, за регулиране на клетъчния отговор към възникнали ДНК увреждания в клетките след приложеното облъчване (Yan, Y. et al., 2008). В нашите резултати експресията на *BRCA1* в групата предварително третирана с 10 µg/ml тотален HRE се установи продължаващо покачване на стойностите, като достигнаха до значителното 6 кратно повишаване (RQ=6.3), спрямо контролата преди облъчване. Резултатите бяха с потвърдена статистическа значимост спрямо контролната група след облъчване ($p<0.05$). За разлика от до тук разгледаните данни в останалите две групи с по-високи концентрации на екстракта експресията на *BRCA1* е близка до стойностите преди облъчване, като в групата с 25 µg/ml тотален HRE, тя спада дори под тях (RQ=0.78). От така наблюдаваните резултати можем да съдим, че предварителното третиране с тотален

HRE с концентрации над 10 µg/ml преди облъчване с 2Gy γ-радиация значително намалява транскрипцията на *BRCA1* довеждайки го до стойности близки до тези на контролата.

BRCA1 играе значителна роля в поддържане на геномната стабилност на клетките в отговор на увреждания възникнали под действието на оксидативен стрес (Wang B., 2012).

Оксидативният стрес играе важна роля, както във възникването на ракови заболявания, така и в тяхното лечение. Съществуват данни за участието на *BRCA1* в регулацията на оксидативния стрес, но точния молекулярен механизъм по който се осъществява не е напълно уточнен. Изследвания върху транскрипционния фактор Nrf2 (NF-E2-related factor 2) ролята му върху антиоксидантната сигнализация, показват, че *BRCA1*, чрез директно взаимодействие с Nrf2 подпомага неговата стабилност и активация (Gorrini C., et al., 2013) в здрави и туморни клетки на млечна жлеза на мишки. Същевременно подтиснатата експресия или делецията на *BRCA1* гена може да промотира увреждания в резултат на оксидативния стрес (Liang W. et al., 2020).

При проведения от нас експеримент беше установено слабо покачване на експресията на *BRCA1* след третиране с 10 mM H₂O₂ спрямо контролната група, но не достатъчно високо за да бъде прието за значително изменение. Въпреки това имайки предвид по горе изложените данни (фиг.23), може да предположим, че спрямо времето на отчитане на експресията на *BRCA1* след приложения оксидативен стрес, това слабо покачване на транскрипционните нива може да се свърже с ролята му в регулацията на антиоксидантната защита.

Значителните разлики в експресията на *BRCA1* в зависимост от типа на генотоксичния стрес, който приложихме още веднъж показват разнообразната роля на *BRCA1* в поддържане на геномната цялост, чрез функционирането му по различни механизми на регулация и контрол (Wu J. et al., 2010).

3.3 RAD51

Основен катализатор на репарацията на двойноверижни разкъсвания на ДНК веригата, чрез хомоложна рекомбинация е *RAD51* гена

RAD51 като основен ген предпазващ клетките от генетична нестабилност е с ниска и строго регулирана експресия в нормални клетки, и обратно, тя е повишена при голяма част от раковите

заболявания. При проведените от нас изследвания с 3 нарастващи концентрации на тотален HRE не беше установено значително изменение на транскрипционните нива на *RAD51* спрямо контролната група (фиг.29).

Проучвания на растителни екстракти и техни компоненти свързани с въздействието върху *RAD51* са провеждани основно за търсене на инхибиторните свойства на веществата върху туморни клетъчни линии. Олеандринът (0.02ug/ml), който е мономерен компонент изолиран от листа и семена на *Nerium oleander* влияе върху експресията на *RAD51*, като я понижава в A549 и H1299 (рак на белия дроб) клетъчни линии (Bao, Z., et al., 2016).

Противоположен на полученият от нас резултат е наблюдаван и при група учени изследвали ефекта на 2 биофлавоноида-кверцетин и тимохинон, 48 часа след третиране на три различни ракови клетъчни линии- MCF-7 (рак на гърда), PC3-(рак на простата) и A-549 (рак на белия дроб). Независимо от клетъчна линия, авторите са установили значително понижаване на експресията на *RAD51* и при двата изследвани биофлаваноида, като свързват получените резултати с инхибиране на експресията на *RAD51* в p-53 зависимия път и индуциране на DSBs в раковите клетки (Karimian A., et al., 2022). Същевременно потвърждават, че оксидантната активност на кверцетина е доза-зависима и високи концентрации от него проявяват про-оксидантна активност (Min, K., and Ebeler, S.E., 2007).

При проследяване на ефекта на 2Gy γ -радиация върху експресията на *RAD51* се установи повишаване на транскрипционните стойности, но без установена статистическа разлика с необлъчената контрола (фиг.22).

Данни от проследяването на влиянието на гама радиацията върху експресията на *RAD51* при предишни проучвания са показали , че тя не се повлиява значително от облъчването, а се свързва основно със субклетъчно преразпределение на протеина от цитоплазмата към ядрото след излагане на 2Gy ЙР при HeLa клетки (Gildemeister, O.S., et al., 2009).

При изследванията върху експресията на *RAD51* при предизвикан оксидативен стрес в клетъчна линия HeLa при предварително третиране с тотален HRE проведени от нас (Фиг.23) се констатира намаляване на транскрипционните нива на *RAD51* до 1.75 пъти при групата без екстракт, като разликата, въпреки че не

достига до двукратно изменение на RQ е със статистическа значимост спрямо контролната група ($p < 0.05$).

Данните на други научни колективи са съсредоточени основно в търсенето на биологични активни субстанции от растителен произход или химично синтезирани вещества, които имат способността да предизвикат оксидативен стрес и двойноверижни разкъсвания на ДНК веригата в търсене на тяхната цитотоксичност върху туморни клетки. Подобни проучвания са провеждани за берберин (алкалоид с растителен произход) за който е установено, че генерира производство на ROS, намалява експресията на *RAD51*, което води до нарушаване на HR в клетъчни линии A2780 (рак на яйчниците), давайки възможност за потенциалното използване на берберина в лечението на рак (Hou, D., et al., 2017). От друга страна, имайки предвидполучените от нас резултати за намалена експресия на *RAD51* след прилагане на 10 mM H_2O_2 може да се предположи, че прилагането на ниски дози H_2O_2 индуцира предимно ДНК разкъсвания в клетки в G1 стадий на клетъчния цикъл. Репарацията на ДНК в този стадий се осъществява предимно, чрез механизма на NHEJ (Sharma, V., et al., 2016).

4. Анализ на относителната генна експресия на гени ефектори на клетъчната съдба- *CDKN1A* и *BBC3* под влияние на тотален HRE самостоятелно и при генотоксичен и оксидативен стрес.

4.1 *CDKN1A*

Проучванията на влиянието на различни растителни екстракти върху експресията на *CDKN1A* при туморни клетъчни линии са свързани предимно с търсене на продукт повишаващ експресията на гена, промотирайки туморните клетки към апоптоза. В проведеният от нас експеримент концентрациите от 10, 25 и 50 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE не повлияха значително експресията на *CDKN1A* (Фиг.24).

Отделни вещества и растителни фракции са показали значително влияние върху експресията на *CDKN1A* върху клетъчна линия HeLa при периоди от 24 часа и повече третиране. Полифеноли получени от *Hohenbuehelia serotina* приложени върху клетъчна линия HeLa са с доказана антитуморната активност, като повишават нивата на мРНК на *TP53* и *CDKN1A* и същевременно потискат експресията на гените *циклин D1*, *Ckd2* и *Cdk4*, в резултат на което се предизвиква апоптоза в изследваните клетки (Wang, L., et al., 2019).

Доказано е ,че широк спектър от стресови стимули включително оксиданти, генотоксини, и облъчване с γ -радиация повлияват генната активност, като сред най-добре изучените медиатори на индукция на p21 от стрес е тумор супресорния ген *TP53*, който действа като транскрипционен активатор (Macleod K.F. et al., 1995).

В нашето проучване изследвахме ефекта на 2 Gy γ -радиация върху експресията на *CDKN1A* в HeLa клетъчна линия, като установихме покачване на транскрипционните нива на мРНК на p21 с 47% в групата без екстракт и продължаващо нарастване и в клетъчни култури третирани с 10 и 25 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE (фиг.25). В групата третирана с 50 $\mu\text{g/ml}$ от екстракта генната експресия се понижи до стойности оптимално близки до тези преди прилагането на екстракт ($p < 0.05$). Повишени транскрипционни стойности на *TP53* и *CDKN1A* при приложена ЙР са докладвани при прилагане на диоспирин диетилов етер изолиран от *Diospyros montana Roxb* (Kumar B., et al., 2007) и кверцетин (Gong C., et al., 2017).

Редица автори докладват за повишаване нива на p21 протеина след предизвикан оксидативен стрес, като третиране с H_2O_2 в различни клетъчни линии в резултат на което се наблюдава клетъчен арест в G2/M фаза на клетъчния цикъл (Seomun, Y. et al., 2005). От друга страна, растителни екстракти прилагани преди третиране с H_2O_2 показват способност да неутрализират вредния ефект на свободните радикали, като по този начин модулират експресията на *CDKN1A*, в резултат на което не се наблюдава спиране на клетъчния цикъл в G2/M фаза.

В получените от нас резултати прилагането на H_2O_2 има противоположен ефект и води до слабо понижаване на експресията на *CDKN1A* в сравнение с контролната група, което не може да се приеме за значително (фиг.26), но въпреки това е отчетена статистическа разлика между резултатите ($p < 0.05$). Прилагането на ниски концентрации от тотален HRE не доведе до забележителна промяна в транскрипционните нива на гена за *CDKN1A*, но при групата с предварително добавен 50 $\mu\text{g/ml}$ екстракт беше отчетена експресия на *CDKN1A* съответстваща на стойностите отчетени преди третирането с H_2O_2 , което се потвърждава и статистически ($p < 0.05$). Наблюдавания резултат е индикативен за антиоксидантните качества на тотален HRE по концентрационно зависим механизъм.

4.2 BBC3

Bcl-2 свързващ компонент 3 гена (*BBC3*), известен още като p53 регулиран модулатор на апоптозата (*PUMA*), кодира проапоптичен протеин, член на Bcl-2 семейство протеини, който чрез своя ВНЗ домейн се свързва с други членове на Bcl-2 семейството, задействайки митохондриални събития свързани с апоптозата. Изследвания върху редица растителни фитохимикали доказват противораковите им свойства, като не позволяват на раковите клетки да потиснат проапоптичните протеини, което би им помогнало да оцелеят в условия на различни видове стрес (Bailon-Moscoso, N., et al. 2017).

В проучване върху диосгенин, фитохимикал изследван при различни патологични състояния, като рак, диабет и кардиологични заболявания се докладва за доза-зависимо индуциране на арест на клетъчния цикъл в S и G2/M фази и апоптоза в резултат на ДНК увреждане, чрез повишаване на транскрипцията на *BBC3* гена в HepG2/C3A (човешки хепатоцелуларен карцином) клетки (Da Silva, M.F. et al., 2022). При извършените от нас изследвания на тотален HRE в 3 различни концентрации върху HeLa клетъчна линия се наблюдаваха противоположни резултати. Установихме, че генната експресия на *BBC3* гена значително намалява при прилагане на 10 и 25 µg/ml от екстракта ($p < 0.05$), като тази тенденция се запазва и при концентрация от 50 µg/ml тотален HRE, макар и в не толкова висока степен (фиг.27). От получените резултати, можем да предположим, че екстракта за краткото време на прилагане не стимулира клетките към апоптоза, а потискайки експресията *BBC3* гена има по-скоро протектиращ и стимулиращ клетките към репарация ефект.

Изследване на няколко групи автори върху въздействието на 2Gy гама радиация върху кръвни проби, показва повишаване на експресия на *BBC3* гена 24 часа след облъчването (Budworth H., et al., 2012), което се свързва с ефекта на гама радиацията да предизвиква DSBs в ДНК веригата, а увредените клетки се насочват към апоптоза.

В проведенят от нас експеримент прилагането на 2Gy гама радиация върху клетъчна линия HeLa понижи с близо 40% на експресията на *BBC3* гена в първите часове след облъчването ($p < 0.05$), тази тенденция се запази и в групата предварително третирана с 10 µg/ml тотален HRE (Фиг.28). Противоположни

резултати бяха наблюдавани в групите третирани с по-високи концентрации на тотален екстракт, съответно експресията на *BBC3* се повиши 4.5 и 6 пъти спрямо контролната група без добавен екстракт. От така получените резултати можем да предположим, че в първите часове след прилагането на ЙР, намалената експресия на *BBC3* гена може да се свърже с потискане на апоптозата, за активиране на механизмите на репарация на ДНК. Високите концентрации на приложения тотален HRE, от своя страна повишавайки значително експресията на гена, вероятно задействат про-апоптичните процеси в изследваната HeLa клетъчна линия.

BBC3 гена, чийто продукт е про-апоптичен протеин предизвиква бърза апотоза, чрез активиране на Вах-зависим път, в следствие на което се освобождава цитохром c и се задейства митохондриално-зависимия апоптотичен път. Доказано съществуването на директна връзка между *BBC3* предизвиканата апотоза и генерирането на ROS (Li. J., et al., 2019).

Получените от нас резултати показаха различна картина от наблюдаваната при въздействието на гама радиация. Директното предизвикване на оксидативен стрес, чрез прилагане на H_2O_2 доведе до повишаване на експресията на *BBC3* гена в HeLa клетъчна линия над 2.5 пъти (фиг.29). При групите предварително третирани с 10 и 25 $\mu g/ml$ тотален HRE преди въздействието с H_2O_2 установихме намаляване на транскрипционните нива на *BBC3* спрямо пробата третирана само с H_2O_2 , но все още над стойностите измерени в не третираната контрола. В групата с най-висока концентрация от 50 $\mu g/ml$ тотален HRE се установи и най-висока експресията на *BBC3*, което е предпоставка за предположение, че изследваната концентрация спомага за активиране на апоптозата в HeLa клетъчна линия.

Подобни резултати са потвърдени и при проучване на DLD-1 клетъчна линия, при която е отчетена повишена експресия на *BBC3* 20 минути след излагане на 5mmol/L H_2O_2 , като тя е продължила да се нараства до 4 часа след прилагането му (Liu, Z. et al., 2005). Установено е, че повишената експресия на *BBC3* се свързва с допълнително генериране на ROS по Вах-зависим механизъм. Оксидативния стрес и свръхпродукцията на ROS предизвикват протеомни промени, като разрушаване на микротубулите и разграждане на статмин и клетките навлизат в апоптоза (Liu, Z. et al., 2005; Yang, J et al., 2017).

На база тези изследвания можем да предположим, че намаляването на експресията на *BBC3* в HeLa клетъчна линия с прилагане на концентрации от 10 и 25 µg/ml тотален HRE е във връзка с доказаните антиоксидантни свойства на екстракта и вероятното намаляване на генерираните ROS.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

От обобщеното анализиране на резултатите, въз основа на проведените експерименти за влиянието на тотален екстракт от *H. rhodopensis* върху генната експресия на клетъчна линия HeLa, както при нормални условия, така и в условия на генотоксичен стрес можем да заключим, че екстрактът е мощен биомодулатор. Има способността да превключва съдбата на клетката между репарация и програмирана клетъчна смърт в зависимост от приложената концентрация и вида на външния стрес.

Екстрактът проявява силно изразен двупосочен ефект върху клетъчната сигнализация, като ниските концентрации (10 µg/ml) стимулират механизмите на репарация (повишена експресия на *TP53*, *RAD50* и *BRCA1*) и потискат апоптоза (понижена експресия на *BBC3*), и обратно с нарастване на концентрацията (50 µg/ml) не се наблюдават значителни изменения в експресията на гените свързани с репарация, но се повишава значително количеството мРНК на проапоптичния ген *BBC3*.

Предварителното третиране с HRE повлиява клетъчния отговор към ЙР. Ниските дози (10 µg/ml) HRE действат синергично с радиацията спрямо някои от гените за репарация (*BRCA1* и *TP53*), увеличения капацитет за поправка води до нарастване на клетъчната преживяемост. При високите дози от екстракта наблюдавания ефект е противоположен, стимулира се експресията на *BBC3* гена, съответно клетъчната смърт.

В условията на оксидативен стрес, ниските дози HRE (10 µg/ml) проявяват антиоксидантна активност, като намаляват ROS и редуцирайки експресията на стрес-индуцираните гени (*ATM*, *TP53*, *BBC3*), като така предпазват клетката от ранна апоптоза. Високите дози HRE (50 µg/ml), имат про-оксидантна активност, не активират механизмите на репарация, но стимулират пътя на апоптоза (*BBC3*), като усилват оксидативния стрес.

ИЗВОДИ

1. Екстрактът от *H.rhodopensis* не проявява цитотоксичен или генотоксичен ефект върху клетъчна линия HeLa дори и при приложението му във най-високата концентрация от изследвания диапазон.
2. Екстрактът от *H.rhodopensis* осъществява дозозависима модулация върху ДНК репаративните механизми. Високите концентрации на екстракта от *H.rhodopensis* (50 µg/ml) не променят значително експресията на ключови гени за репарация (*ATM*, *RAD51*, *CDKN1A*), ниски концентрации (10 µg/ml) индуцират слабо изразена, но отчетлива, повишена експресията на *TP53* и *RAD50* и приблизително двукратно увеличение на *BRCA1*.
3. Антиоксидантните свойства на екстракта (дължащи се на наличието на миконазид), осигуряват време на клетката за репарация, преди включване на програмираната клетъчна смърт, като всички изследвани концентрации (10, 25, 50 µg/ml) понижават експресията на проапоптичния ген *BBC3*.
4. Екстрактът от *H.rhodopensis* проявява различен модулиращ ефект в зависимост от вида на приложения стресов фактор и дозата на екстракта
 - 4.1. Приложението на HRE в ниски концентрации (10 µg/ml) проявява **цитопротективен ефект**, като се повишават репарационните клетъчни механизми. Установено е синергично действие на екстракта с радиационния стресов фактор като се индуцира повишена експресията на *TP53* (3 пъти) и *BRCA1* (6 пъти).
 - 4.2. Приложението на HRE във високи концентрации (25 и 50 µg/ml) вероятно индуцира **проапоптичен ефект**, като при гама-облъчване се понижават репаративните механизми чрез редукция на експресия на *ATM* и *BRCA1* до

контролните нива и се стимулира апоптозата (*BBC3* нараства над 4-6 пъти).

- 4.3. Ниската концентрация (10 µg/ml) на HRE проявява **антиоксидантно действие** като ефективно намалява цитотоксичния ефект на H₂O₂, което води до понижена експресия на стрес-индуцируемите и проапоптични гени (*ATM*, *TP53*, включително *BBC3*).
- 4.4. Във високи концентрации (50 µg/ml) HRE проявява **про-оксидантно действие**, което предполага ефект към стимулиране на апоптозата (трикратно нарастване на експресията на *BBC3*) при отсъствие на активиране на репаративните системи.

ПРИНОСИ

Научно-теоретични приноси

С оригинален характер

1. Установен е доза-зависим характер на биологичното действие на тотален HRE върху транскрипционната активност на HeLa клетки. Доказан е двупосочният ефект, който проявява екстракта: **цитопротективен** при ниски концентрации (10 $\mu\text{g/ml}$), чрез активиране на пътищата за репарация и **про-апоптичен** при високи концентрации (50 $\mu\text{g/ml}$), чрез стимулиране на гена *BBC3*.
2. Доказан е синергичен ефект между ниски концентрации HRE (10 $\mu\text{g/ml}$) и γ -радиация водещ до значителна (до 6 пъти) свръх експресия на репарационния ген *BRCA1*. Това предполага, че в ниски дози екстрактът сенсibiliзира клетките за по-ефективен отговор към радиационен стрес.
3. Доказана е ролята на HRE като биомодулятор на оксидативния стрес предизвикан от H_2O_2 . Установено е, че при ниски дози екстрактът действа като **антиоксидант**, потискайки стрес индуцираната апоптоза, докато при високи дози действа като **про-оксидант**, който допълнително активира навлизане на клетките в програмирана клетъчна смърт.

С потвърдителен характер

1. Потвърждава се, че при облъчване с доза от 2 Gy γ -радиация се активират специфични сигнални пътища, свързани с двуверижни разкъсвания на ДНК. Увеличената експресия на гените *ATM*, *TP53*, *BRCA1*, *RAD51* и *CDKN1A* е маркер за активиране на системата за поправка.
2. Потвърждава се, че третирането с 10 mM H_2O_2 предизвиква различен тип повреди, които за конкретния времеви период (3 часа), активират директно апоптозата (чрез *BBC3*), вместо репарация, характерна за йонизиращата радиацията.

3. Потвърждават се антиоксидантните свойства на *Haberlea rhodopensis*, посредством установеното присъствие на полифенола миконазид.
4. Потвърждава се, че претретирането с ниски концентрации от екстракт на *Haberlea rhodopensis*, неутрализира част от ефектите на приложен H_2O_2
5. Получените резултати подкрепят общоприетия принцип, че ефектът от растителни природни екстракти е тясно зависим от използваната концентрация.

Списък на публикации и участия в научни форуми, във връзка с дисертационния труд

Публикации:

1. **Dimitrova, N.**, Staneva, D., Popov, B., Alexandrova, A., Georgieva, M., & Miloshev, G. *Haberlea rhodopensis* alcohol extract normalizes stress-responsive transcription of the human TP53 gene. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*.2023; 11(2), 405–415. (SJR₂₀₂₃=0.164) Q4
2. Staneva, D.; **Dimitrova, N.**; Popov, B.; Alexandrova, A.; Georgieva, M.; Miloshev, G. *Haberlea rhodopensis* Extract Tunes the Cellular Response to Stress by Modulating DNA Damage, Redox Components, and Gene Expression. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24(21), 15964.(IF₂₀₂₃=4.9, SJR₂₀₂₃=1.18) Q1
3. **Dimitrova N**, Popov B., Biological Effects of Secondary Plant Metabolites on the Expression of Key Factors Involved in DNA Damage Response Signaling Pathway and Apoptosis in Cancer Cell Lines. *International Journal of Science and Research (IJSR)*.2023;12(1): 533-541

Участия в научни форуми:

1. **Dimitrova Neli**, Borislav Popov, Milena Georgieva, Dessislava Staneva, Georgi Miloshev (2018). Radioprotective extracts of *Haberlea rhodopensis* generate important changes in the expression of TP53 gene in human cells. 28ма Международна конференция за съюз на учените-Стара Загора „Българско Европредседателство-иновации и просперитет“ 2018 Старозагорски Мин. Бани, Book of abstracts, p.36-37
2. **Dimitrova Neli**, Borislav Popov, Milena Georgieva, Dessislava Staneva, Georgi Miloshev (2018). *H. rhodopensis* extracts influence genome activity of cell aiding it cope with damaging effects. SECOND YOUNG SCIENTISTS SEMINAR ON GENETIC WITH INTERNATIONAL PARTICIPATION-SGIP 2018, Sofia, October 3-5, 2018. Book of abstracts, p.19
3. **Dimitrova N.**, Popov B., Staneva D., Vasileva M., Miloshev G., (2019). Extracts from *Haberlea rhodopensis* influence the expression of stress responsive gene for p21 without changing the

activity of Rad51 gene. J.Biomed.Clin.Res. Volume 12, Number1, Supplement 2, p. 130

4. **Neli Dimitrova**, Borislav Popov, Desislava Staneva,, Milena Georgieva, Georgi Miloshev (2025). Differences in the effect of *Haberlea rhodopensis* extract on the expression of the proapoptotic gene BBC3. XV национална конференция по Медицинска биология 6-8 юни 2025г. гр. Стара Загора, Book of abstracts, p.33

Научно-изследователски проекти във връзка с дисертационния труд:

НИП 6/2018 Изследване на молекулярните механизми на антиоксидативното и радиопротективно действие на тотален екстракт от „*Haberlea rhodopensis*” с ръководител доц. д-р Борислав Попов, д.м.

SUMMARY

There is a significant group of natural products of plant origin that have proven antimutagenic, anticarcinogenic and radioprotective potential. In view of the ongoing search for the ideal antimutagen, plant extracts with their diversity of phytochemical substances in many respects outperform synthetic products with similar action in biological activity. The resurrection plant, *Haberlea rhodopensis*, is a Balkan relict endemic, whose chemical composition has been studied by many research groups leading to the identification of bioactive compounds with proven antioxidant and cytoprotective potential.

The aim of the present study was to investigate the early response of HeLa cancer cells to gamma ionizing radiation (γ -IR) and reactive oxygen species (ROS)-induced oxidative stress after the preincubation with different concentrations *Haberlea rhodopensis* extract (HRE). We investigated the cellular defense mechanisms activated by plant extracts to counteract the damaging effects of γ -IR and ROS. We evaluate the molecular effects of HRE by quantifying the transcription levels of several critical genes associated with DNA repair, cell cycle regulation, and apoptosis as well as by assessing its influence on the cell cycle and genome integrity by flow cytometry.

Our findings demonstrate lack of toxicity of the HRE, even the high concentrations (50 μ g/ml) do not significantly change the expression of key DNA repair genes (*ATM*, *RAD51*, *CDKN1A*), suggesting that the extract itself does not cause severe DNA damage. The antioxidant properties of the extract (due to the presence of miconazide) provide cells with time for repair before the activation of programmed cell death. All tested concentrations (10, 25, 50 μ g/ml) reduce the expression of the pro-apoptotic gene *BBC3*. HRE exhibits a distinct modulatory effect depending on the type of stress; specifically, the applied dose determines the nature of its biological action on the gene activity of HeLa cells. HRE shows cytoprotective effects at low concentrations (10 μ g/ml), by activating DNA repair pathways and pro-apoptotic activity at high concentrations (50 μ g/ml), by stimulating the *BBC3* gene expression. A synergistic effect was evident between low concentrations of HRE (10 μ g/ml) and γ -radiation leading to a significant (up to 6-fold) overexpression of the DNA repair gene *BRCA1*. This result suggests that at low doses the extract sensitizes cells to a more effective

response to radiation-induced stress. Furthermore, HRE acts as a biomodulator of oxidative stress induced by H₂O₂.

In conclusion, the dose-dependent dual role of *Haberlea rhodopensis* extract was demonstrated. At low doses, the extract functioned as an antioxidant by suppressing stress-induced apoptosis, while at high doses, it showed pro-oxidant properties, further activating programmed cell death.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Anjaly, K., & Tiku, A. B. (2022). Caffeic acid phenethyl ester induces radiosensitization via inhibition of DNA damage repair in androgen-independent prostate cancer cells. *Environmental Toxicology*, 37(5), 995–1006. <https://doi.org/10.1002/tox.23459>
2. Anna C. Howes *et al.*, Structural insights into the activation of ataxia-telangiectasia mutated by oxidative stress. *Sci. Adv.* 9, eadi8291 (2023). DOI:10.1126/sciadv.adi8291
3. Bai, Y., Zhao, Y., Li, Y., Xu, J., Fu, X., Gao, X., ... & Li, Z. (2020). UV-shielding alginate films crosslinked with Fe³⁺ containing EDTA. *Carbohydrate polymers*, 239, 115480.
4. Bailon-Moscoso, N.; Cevallos-Solorzano, G.; Romero-Benavides, J.C.; Orellana, M.I.R. Natural Compounds as Modulators of Cell Cycle Arrest: Application for Anticancer Chemotherapies. *Curr. Genom.* 2017, 18, 106–131.
5. Bao, Z., Tian, B., Wang, X., Feng, H., Liang, Y., Chen, Z., Li, W., Shen, H., & Ying, S. (2016). Oleandrin induces DNA damage responses in cancer cells by suppressing the expression of Rad51. *Oncotarget*, 7(37), 59572. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10726>
6. Berkov, Strahil & Nikolova, Milena & Hristozova, Nevena & Momekov, Georgi & Ionkova, Iliana & Djilianov, Dimitar. (2011). GC-MS profiling of bioactive extracts from *Haberlea rhodopensis*: An endemic resurrection plant. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 76. 211-220. 10.2298/JSC100324024B.
7. Bian L, Meng Y, Zhang M, Guo Z, Liu F, Zhang W, Ke X, Su Y, Wang M, Yao Y, Wu L, Li D. ATM Expression Is Elevated in Established Radiation-Resistant Breast Cancer Cells and Improves DNA Repair Efficiency. *Int J Biol Sci.* 2020 Feb 4;16(7):1096-1106. doi: 10.7150/ijbs.41246.
8. Bishayee, K., Paul, A., Ghosh, S. *et al.* Condurango-glycoside-A fraction of *Gonolobus condurango* induces DNA damage associated senescence and apoptosis via ROS-dependent p53 signalling pathway in HeLa cells. *Mol Cell Biochem* 382, 173–183 (2013). <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1732-5>
9. Budworth H, Snijders AM, Marchetti F, Mannion B, Bhatnagar S, Kwoh E, Tan Y, Wang SX, Blakely WF, Coleman M, Peterson L, Wyrobek AJ. DNA repair and cell cycle biomarkers of radiation exposure and inflammation stress in human blood. *PLoS One.* 2012;7(11):e48619. doi: 10.1371/journal.pone.0048619.
10. Chen T, Stephens PA, Middleton FK and Curtin NJ: Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer. *Drug Discov Today*. 17:194–202. 2012.

11. Cosentino C, Grieco D, Costanzo V. ATM activates the pentose phosphate pathway promoting anti-oxidant defence and DNA repair. *EMBO J.* 2011 Feb 2;30(3):546-55. doi: 10.1038/emboj.2010.330.
12. Da Silva, M. F., De Lima, L. V. A., Zanetti, T. A., Felicidade, I., Favaron, P. O., Lepri, S. R., Lirio Rondina, D. B., & Mantovani, M. S. (2022). Diosgenin increases BBC3 expression in HepG2/C3A cells and alters cell communication in a 3D spheroid model. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 879-880, 503512. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2022.503512>
13. Félix Leroy, Boris Lamotte d'Incamps. Rebecca D Imhoff-Manuel, Daniel Zytnicki (2014) Early intrinsic hyperexcitability does not contribute to motoneuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis, *eLife* 3:e04046.
14. Georgieva S, L. Sotirov, B. Popov, T. Koynarski.. Impact of the Haberlea rhodopensis extract on the innate immune system and response in rabbits following KLH-hemocyanin immunization and cyclophosphamide treatment. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* . 2013b, Vol. 37: No. 6,, 659-663: ISSN 1300-0128
15. Gildemeister, O. S., Sage, J. M., & Knight, K. L. (2009). Cellular Redistribution of Rad51 in Response to DNA Damage. *Journal of Biological Chemistry*, 284(46), 31945-31952. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.024646>
16. Gong, C., Yang, Z., Zhang, L., Wang, Y., Gong, W., & Liu, Y. (2017). Quercetin suppresses DNA double-strand break repair and enhances the radiosensitivity of human ovarian cancer cells via p53-dependent endoplasmic reticulum stress pathway. *Oncotargets and therapy*, 17-27.
17. Gorrini C, Baniasadi PS, Harris IS, Silvester J, Inoue S, Snow B, Joshi PA, Wakeham A, Molyneux SD, Martin B, Bouwman P, Cescon DW, Elia AJ, Winterton-Perks Z, Cruickshank J, Brenner D, Tseng A, Musgrave M, Berman HK, Khokha R, Jonkers J, Mak TW, Gauthier ML. BRCA1 interacts with Nrf2 to regulate antioxidant signaling and cell survival. *J Exp Med.* 2013 Jul 29;210(8):1529-44. doi: 10.1084/jem.20121337.
18. Guo Z, Deshpande R, Paull TT. ATM activation in the presence of oxidative stress. *Cell Cycle.* 2010 Dec 15;9(24):4805-11. doi: 10.4161/cc.9.24.14323.
19. Hou, D., Xu, G., Zhang, C., Li, B., Qin, J., Hao, X., Liu, Q., Zhang, X., Liu, J., Wei, J., Gong, Y., Liu, Z., & Shao, C. (2017). Berberine induces oxidative DNA damage and impairs homologous recombination repair in ovarian cancer cells to confer increased sensitivity to PARP inhibition. *Cell Death & Disease*, 8(10), e3070. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.471>
20. Karimian, A., Majidinia, M., Moliani, A., Alemi, F., Asemi, Z., Yousefi, B., & Fazlollahpour naghbi, A. (2022). The modulatory effects of two bioflavonoids, quercetin and thymoquinone on the expression levels of DNA damage and repair genes in human breast, lung and prostate cancer

- cell lines. *Pathology - Research and Practice*, 240, 154143. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.154143>
21. Kasthuber ER, Lowe SW. Putting p53 in Context. *Cell*. 2017 Sep 7;170(6):1062-1078. doi: 10.1016/j.cell.2017.08.028.
 22. Kumar, B., Joshi, J., Kumar, A., Pandey, B. N., Hazra, B., & Mishra, K. P. (2007). Radiosensitization by diospyrin diethylether in MCF-7 breast carcinoma cell line. *Molecular and cellular biochemistry*, 304, 287-29
 23. Kuroda S, Urata Y, Fujiwara T. Ataxia-telangiectasia mutated and the Mre11-Rad50-NBS1 complex: Promising targets for radiosensitization *Acta Med Okayama*. 2012;66:83–92
 24. Kuruc, T.; Kello, M.; Petrova, K.; Kudlickova, Z.; Kubatka, P.; Mojzis, J. The Newly Synthetized Chalcone L1 Is Involved in the Cell Growth Inhibition, Induction of Apoptosis and Suppression of Epithelial-to-Mesenchymal Transition of HeLa Cells. *Molecules* 2021, 26, 1356. <https://doi.org/10.3390/molecules26051356>
 25. Lee JH, Mand MR, Kao CH, Zhou Y, Ryu SW, Richards AL, Coon JJ, Paull TT. ATM directs DNA damage responses and proteostasis via genetically separable pathways. *Sci Signal*. 2018 Jan 9;11(512):ean5598. doi:10.1126/scisignal.aan5598..
 26. Lee JH, Paull TT. Mitochondria at the crossroads of ATM-mediated stress signaling and regulation of reactive oxygen species. *Redox Biol*. 2020 May;32:101511. doi: 10.1016/j.redox.2020.101511.
 27. Li, C., Chen, H., Chen, X., Wang, P., Shi, Y., Xie, X., Chen, Y., & Cai, X. (2024). Identification of inflammatory response-related molecular mechanisms based on the ATM/ATR/p53 pathway in tumor cells. *Computers in Biology and Medicine*, 180, 108776. doi.org/10.1016/j.combiomed.2024.108776
 28. Li, J.; Zhang, S.; Zhang, M.; Sun, B. Novel approach for extraction of grape skin antioxidants by accelerated solvent extraction: Box–Behnken design optimization. *J. Food Sci. Technol*. 2019, 56, 4879–4890.
 29. Liang W, Liu D, Li M, Wang W, Qin Z, Zhang J, Zhang Y, Hu Y, Bao H, Xiang Y, Wang B, Wu J, Sun J, Hu C, Ye X, Zhang X, Xiao W, Yun C, Sun D, Wang W, Chang N, Zhang Y, Zhao J, Zhang X, Xu J, Wu D, Liu X, Guo Y, Zhang Q, Zhang W, Yang L, Li Z, Zhang X, Han B, Tong Z, He J, Qu J, Fan JB, Zhong N.. Evaluating the diagnostic accuracy of a ctDNA methylation classifier for incidental lung nodules: protocol for a prospective, observational, and multicenter clinical trial of 10,560 cases. *Transl Lung Cancer Res*. 2020 Oct;9(5):2016-2026. doi: 10.21037/tlcr-20-701.
 30. Liu, Z., Lu, H., Shi, H., Du, Y., Yu, J., Gu, S. & Hu, C. A. A. (2005). PUMA overexpression induces reactive oxygen species generation and

- proteasome-mediated stathmin degradation in colorectal cancer cells. *Cancer research*, 65(5), 1647-1654.
31. Macleod K. F.; Sherry N.; Hannon G.; Beach D.; Tokino T.; Kinzler K.; Vogelstein B.; Jacks T. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev.* 9:935–944; 1995.
 32. Min, K., & Ebeler, S. E. (2007). Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. *Food and Chemical Toxicology*, 46(1), 96-104. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.07.002>
 33. Park WH: The effect of MAPK inhibitors and ROS modulators on cell growth and death of H2O2-treated HeLa cells. *Mol Med Rep* 8: 557-564, 2013
 34. Peeva, M. I., Georgieva, M. G., Balacheva, A. A., Pavlov, A., Tzvetkov, N. T., A., & Tzvetkov, N. T. (2024). In Vitro Investigation of the Cytotoxic and Antiproliferative Effects of Haberlea rhodopensis Total Extract: A Comparative Study. *Cosmetics*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/cosmetics11020046>
 35. Popov B.,S. Georgieva, M. Oblakova, G. Bonev (2013). Effects of Haberlea rhodopensis extract on antioxidation and lipid peroxidation in rabbits after exposure to 60Co-γ-rays. *Archives of Biological Sciences*, 2013, 65 (1), 91-97. ISSN: 0354-4664
 36. POPOV, b., R. RADEV & S. GEORGIEVA (2010a). In vitro incidence of chromosome aberrations in gamma-irradiated rabbit lymphocytes, treated with Haberlea rhodopensis extract and vitamin C”. *Bulg. J. Vet. Med.*, 13, No 3, pp.148-153.
 37. Posakony JW, England JM, Attardi G. Mitochondrial growth and division during the cell cycle in HeLa cells. *J Cell Biol.* 1977 Aug74(2):468-91. p.473 left column 5th paragraph
 38. Sadia Perveen, Hanfa Ashfaq, Saira Ambreen, Isbah Ashfaq, Zakia Kanwal, Asima Tayyeb, Methanolic extract of Citrullus colocynthis suppresses growth and proliferation of breast cancer cells through regulation of cell cycle, *Saudi Journal of Biological Sciences*, Volume 28, Issue 1, 2021, Pages 879-886, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.029>.
 39. Seomun, Y., Kim, J. T., Kim, H. S., Park, J. Y., & Joo, C. K. (2005). Induction of p21Cip1-mediated G2/M arrest in H2O2-treated lens epithelial cells. *Mol Vis*, 11, 764-774.
 40. Sharma, V., Collins, L. B., Herr, N., Takeda, S., Sun, W., Swenberg, J. A., & Nakamura, J. (2016). Oxidative stress at low levels can induce clustered DNA lesions leading to NHEJ mediated mutations. *Oncotarget*, 7(18), 25377. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8298>
 41. Wang B. BRCA1 tumor suppressor network: focusing on its tail. *Cell Biosci.* 2012;2:1–10.

42. Wang, L., Li, X., & Wang, B. (2019). The cytotoxicity activity of *Hohenbuehelia serotina* polyphenols on HeLa cells via induction of cell apoptosis and cell cycle arrest. *Food and Chemical Toxicology*, 124, 239-248. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.12.001>
43. Wang, Y., Yu, H., Zhang, J., Gao, J., Ge, X., & Lou, G. (2015). Hesperidin inhibits HeLa cell proliferation through apoptosis mediated by endoplasmic reticulum stress pathways and cell cycle arrest. *BMC cancer*, 15(1), 682.
44. Wu, J., Lu, L.Y. & Yu, X. The role of BRCA1 in DNA damage response. *Protein Cell* 1, 117–123 (2010). <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0010-5>
45. Yan, Y. *et al.* Gamma-irradiation-induced DNA damage checkpoint activation involves feedback regulation between extracellular signal-regulated kinase 1/2 and BRCA1. *Cancer Res.* 68, 5113–5121 (2008).
46. Yang, J., Zhao, X., Tang, M., Li, L., Lei, Y., Cheng, P., Guo, W., Zheng, Y., Wang, W., Luo, N., Peng, Y., Tong, A., Wei, Y., Nie, C., & Yuan, Z. (2017). The role of ROS and subsequent DNA-damage response in PUMA-induced apoptosis of ovarian cancer cells. *Oncotarget*, 8(14), 23492. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15626>
47. Zasheva, D.; Mladenov, P.; Rusanov, K.; Simova, S.; Zapryanova, S.; Simova-Stoilova, L.; Moyankova, D.; Djilianov, D. Fractions of Methanol Extracts from the Resurrection Plant *Haberlea rhodopensis* Have Anti-Breast Cancer Effects in Model Cell Systems. *Separations* 2023, 10, 388. <https://doi.org/10.3390/separations10070388>
48. Zhao H, Zhuang Y, Li R, Liu Y, Mei Z, He Z, Zhou F, Zhou Y. Effects of different doses of X-ray irradiation on cell apoptosis, cell cycle, DNA damage repair and glycolysis in HeLa cells. *Oncol Lett.* 2019 Jan;17(1):42-54. doi: 10.3892/ol.2018.9566.

БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам моята искрена благодарност на научния ми ръководител доц. д-р Борислав Попов за експертното ръководство, насоки и подкрепа при разработването на настоящия дисертационен труд!

Отправлям изключителна благодарност към проф. Георги Милошев дб, проф. Милена Георгиева дб и доц. Десислава Станева дб за доверието и предоставената възможност за обучение и провеждане на експерименталната работа по настоящия дисертационен труд в Лаборатория по Молекулярна генетика на дрожди, Институт по молекулярна биология, „Академик Румен Цанев“, към БАН, гр. София.

Благодаря сърдечно на доц. Люба Митева и колегите от катедра „Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика“ за приятелската подкрепа, препоръки и напътствия!

Специални благодарности дължа на моето семейство, за тяхното безусловно разбиране, обич и морална подкрепа, които ми даваха във всеки един момент от този дълъг път!