

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО БИОФИЗИКА И БИОМЕДИЦИНСКО
ИНЖЕНЕРСТВО

Секция „Електроиндуцирани и адхезивни свойства”

Виктория Николаева Пехливанова

Влияние на електрични импулси и антитуморни
агенти върху адхезивното поведение на ракови
и соматични клетки

АВТОРЕФЕРАТ

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

Научна специалност
4.3 – Биологически науки
(стар шифър – 01.06.08 – Биофизика)

Научен ръководител: проф. д-р Яна Цонева, д.б.н.
Научен консултант: доц. д-р Румяна Цонева

София
2013 г.

Благодарности:

Бих желала да изкажа благодарност на **проф. Я. Цонева** за възможността да бъда докторант в нейната група, за предоставената ми тема и осигурена много добра материална база за работа както и за оказаната ми морална подкрепа през цели период на обучение.

Изказвам благодарност на **доц. Р. Цонева** за изключителната помощ по време на научните изследвания, усвояването на методиките, за научните дискусии по актуални проблеми, както и за всестранныя помощ във всеки един от етапите на подготовката на дисертационния труд.

Благодаря и на **моите родители** за непрекъснатата грижа и силна подкрепа.

Списък на използваните съкращения

Съкращения:	Значение:
ЕЦМ	екстрацелуларен матрикс
АФХ	алкилфосфохолини
ATCC	американска клетъчна колекция
DAPI	4',6-диамидин-2'-фенилиндол дихидрохлорид
DMEM	хранителна среда за клетъчни линии
DMSO	диметил сулфоксид
EDTA	етилендиаминтетраоцетна киселина
EPC ₃	ecucylphospho-N,N,N – trimethylpropylammonium/ еруфозин
FCS	фетален телешки серум
MMP	мембранни металопротеинази
IC ₅₀	половин максимална инхибиторна концентрация
NEAA	неесенциални аминокиселини
PBS	фосфатен буфер
PI	пропидиев йодид
PFA	параформалдехид
RPMI–1640	хранителна среда за клетъчни линии
BSA	бичи серумен албумин
HCl	солна киселина
EMII	епително-мезенхимно

E	преобразуване
V_m	интензитет на полето естествен трансмембранен потенциал
V_c	критичен електроиндуциран мембранен потенциал
V_g	електроиндуциран трансмембранен потенциал
F	размерен фактор
Λ	електропроводимост на средата
Θ	ъгълът между посоката на електричното поле и произволно избрана точка
R	радиус на клетката
g(λ)	физиологичен фактор, който зависи от електропроводимостта на средата
M	затворено състояние на бислоя
(P_{HO})_r	хидрофобна пора с радиус r
(P_{HI})_r	хидрофилна пора с радиус r
R_c	критичен радиус
P_{CR}	кратероподобна пора
D	дебелина на бислоя
CHO	овариални клетки от хамстер
p53PB	тумор супресорен ген
c-Myc	онкоген
Gap1 (G1)	фаза, в която клетката се подготвя за синтез на ДНК
S	фаза на ДНК синтез и репликация
Gap2 (G2)	фаза на синтез на протеини
M	фаза на хромозомно разделяне и клетъчно делене

Gap0	фаза на покой-клетката не расте и не се размножава
Akt-mTOR	сигнален път
PI3K	фосфоинозитид-3-киназно семейство
FN	фибронектин
MDA-MB-231	клетъчна линия от рак на млечната жлеза
MCF-7	клетъчна линия от рак на млечната жлеза
MCF-10A	епителни клетки от млечната жлеза
3T3	миши фибробласти
RPM	ротационна скорост (оборот/мин.)
St	тотална повърхност на дъното на плаките
Se	област заградена между електродите
Л	ламелоподия
Ф	филоподия
LAMA 84	хронични миелоидни клетки
Rho	семейство от малки сигнални G-белтъци
GTP	семейство на хидролазни ензими със субстрат гуанозин трифосфат
OPM-2	полимиеломни клетки
U-266	полимиеломни клетки
CAMs	клетъчно адхезионни молекули
ER	естрогенен рецептор
PR	прогестеронен рецептор
HER2	човешки епидермален растежен рецептор 2

Въведение

Прилагането на външно електрично поле може да предизвика множество значителни биохимични и/или физиологични промени в клетки, тъкани, органи, или цели организми. Електричните полета, както постоянни, така и променливи, намират все по-голямо приложение в медицинската практика. Те се използват за пренос на гени в животински и растителни клетки, производство на моноклонални антитела, ускоряване възстановяването на костни фрактури, заздравяването на рани и пренос на лекарства в клетките при антитуморната електро(химио)терапия. Високоволтовите електрични импулси създават върху мембраната напрежение, което би могло да доведе до електричен пробив и възникване на нанопори в мембраната и най-често това се свързва с процеса **електропорация (електропермеабилзация)**. Ефикасността на приложените електрични импулси при електро(химио)терапията се изразява в увеличаване на усвояването и акумулирането на цитостатиците в туморната клетка и нарастване на техния цитотоксичен ефект.

Независимо от извънредния напредък в диагностицирането и лечението, **ракът на гърдата** е сред първите по смъртност онкологични заболявания в света. Това се дължи главно на високия му метастатичен потенциал и резистентност към стандартно прилаганите химиотерапевтици (антрациклини и таксани), водещи и до сериозни странични ефекти. Всичко това налага търсенето на нови средства и терапевтични схеми за по-ефективно третиране и лечение.

Алкилфосфохолините (АФХ) са нова група антитуморни агенти, които показват цитотоксична активност срещу различни туморни клетъчни линии *in vitro* и антинеопластична активност *in vivo*. За разлика от конвенционалните химиотерапевтични лекарства, които действат директно на ниво ДНК, АФХ действат на ниво клетъчна мембрана. Тъй като са повърхностно активни вещества, във високи концентрации те могат да предизвикат лизиране на клетките. При по-ниски концентрации метаболитно стабилните алкилфосфохолини се намесват в обмяната на фосфолипидите и сигнално-трансдукционните пътища. Намесата в липидните метаболитни пътища предизвиква стрес в клетката, който може да задейства

програмирана клетъчна смърт (апоптоза), като се повлияват специфично само раковите клетки, докато немодифицираните клетки остават незасегнати от действието им. Някои левкемични клетъчни линии отговарят на действието на интравенозно инжектираните алкилфосфохолини с конверсия към адхерентност, фибробласт-подобен клетъчен фенотип.

Клетъчната адхезията е фундаментален процес в ембрионалното развитие, за поддържане на клетъчната полярност, в заздравяването на рани, в ангиогенезата и в процеса на образуване на злокачествените тумори. Тя играе ключова роля във всички етапи от туморното развитие - от неговото първоначално формиране, нарастване и разпространение (метастазирание). Основните особености на раковите клетки е намалената адхезия и слаба цитоскелетна организация. Промените в тяхното адхезивно поведение определят модифицираната им морфология и миграционно поведение, на които се дължат инвазивните им свойства. Така манипулирането (чрез външни стимули като прилагане на електрично поле) на адхезията на туморните клетки може да постигне регулиране на растежа и инвазивните им свойства.

Досега няма данни за влиянието на еруфозина и на електричните полета върху клетъчната адхезия. Ето защо едно изследване на влиянието на високоволтовите електрични импулси (използвани при електро(химио)терапията) и еруфозина върху адхезивните свойства на туморните клетки би допринесло за изясняване ролята на клетъчната адхезия в анти-туморния ефект на електро(химио)терапията.

Цели и задачи

Независимо от някои трудове, които се отнасят до промените в цитоскелета предизвикани от електричните импулси [Blangero C. et al., 1989; Kanthou C. et al., 2006; Rosazza C. et al., 2011], малко се знае за влиянието на електричното поле по време на процеса електропорация върху актиновия цитоскелет на туморни адхерентни клетки. Също така няма данни и за влиянието на еруфозина (EPC₃), който проявява своя противотуморен ефект на ниво биологична мембрана, върху адхезивното и миграционно поведение на ракови клетки. Комбинираното прилагане на лекарството с електрично поле на адхерентни ракови клетки *in vitro* досега не е изследвано. Въз основа на това си поставихме следните цели:

1. Да се проследи ефекта на бифазни (биполярни) електрични импулси (200V/cm-1000V/cm) върху адхезивното поведение и преживяемост на две туморни клетъчни линии от рак на гърдата и една нетрансформирана клетъчна линия, за доказване ефекта на електричното поле върху адхезивното клетъчно поведение и туморната прогресия.

2. Да се проследи ефекта на еруфозина върху клетъчната преживяемост, клетъчната смърт и реорганизация на цитоскелета на туморни и нетуморогенни клетки.

3. Да се изследва комбинираното цитотоксично влияние на еруфозин и приложено електрично поле (електропорация) върху реорганизацията на актиновия цитоскелет, миграционен потенциал и способността да се индуцира апоптоза.

За изпълнение на горните цели са поставени следните задачи:

- Изучаване степента на електропориране на клетъчната мембрана и обратимостта на процеса като функция от прилагания интензитет на високоволтови биполярни електрични импулси;
- Изучаване на обща клетъчна адхезия и преживяемост на туморни и нетуморогенни клетки под действието на електрични импулси;
- Влияние на високоволтови импулси върху организацията на актиновия цитоскелет;
- Изучаване клетъчната преживяемост и цитотоксичност при третиране с еруфозин самостоятелно и в комбинация с електрично поле;

- Изследване индукцията на клетъчна смърт и реорганизация на цитоскелета след третиране с еруфозин самостоятелно и в комбинация с електрично поле;
- Изследване миграционния потенциал на ракови клетки след прилагането на еруфозин и електрично поле.

Материали и методи

1. Материали

- 1.1. DAPI
- 1.2. Еруфозин
- 1.3. Кристал виолет
- 1.4. Пропидиев йодид (PI)
- 1.5. BODIPY 558/568 – свързан фалоидин
- 1.6. Човешки плазмен фибронектин
- 1.7. Клетъчни линии

2. Методи

- 2.1. Третиране с еруфозин
- 2.2. Клетъчна електропорация
- 2.3. Определяне нивото на електропермеабилзация
- 2.4. Клетъчна адхезия (оцветяване с кристал виолет)
- 2.5. Клетъчна преживяемост
- 2.6. Оцветяване за актин
- 2.7. Оцветяване за тубулин
- 2.8. Оцветяване на ядрото с DAPI
- 2.9. FACS анализ

2.10. Клетъчна миграция

2.11. Статистически анализ

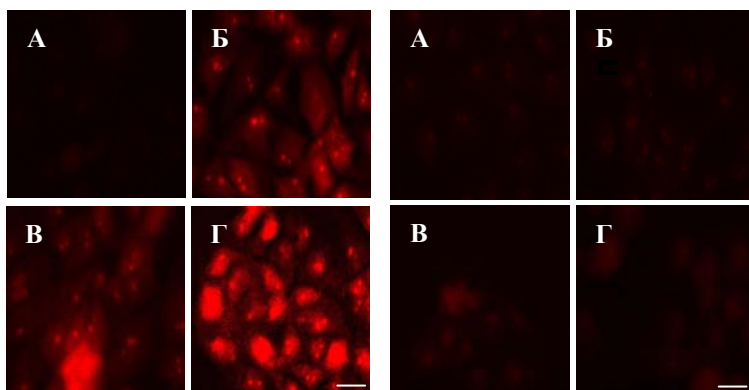
Резултати и дискусия

1. Влияние на електрично поле върху

клетъчното поведение

1.1. Степен на клетъчна електропорация

Проникването на пропидиев йодид (PI) в 3T3 клетките беше използвано за определяне пермеабилитетът на клетъчната мембрана вследствие на процеса електропорация. Резултатите сочат наличие на пермеабилитет и при трите използвани интензитета на полето (Фиг. 1.1.Б-Г). От интензитета на флуоресценция на погълнатия PI от клетките (снимките са направени при еднакви параметри на експониране на препарата, яркост, контраст и т. н.), може да се заключи, че електропорацията при 200V/cm и 500V/cm е по-слаба от тази при 1000V/cm (Фиг. 1.1.). Резултатите показват, че съдържанието на PI в клетката се увеличава при по-високи импулси. На фигура 1.2. не се наблюдава проникване на пропидиев йодид 24 часа след електротретирането, което демонстрира обратимостта на процеса на електропорация.



Фиг. 1.1. 3Т3 клетки електропорираны в присъствие на пропидиев йодид и инкубирани 15 минути. (А) контрола (непорираны клетки), (Б) клетки електропорираны с 200V/cm, (В) с 500V/cm, (Г) с 1000V/cm. Барът е 40μm.

Фиг. 1.2. 3Т3 клетки оцветени с пропидиев йодид 24 часа след електропорация. (А) контрола, (Б) клетки електропорираны с 200V/cm, (В) с 500V/cm, (Г) с 1000V/cm. Барът е 40μm.

1.2. Клетъчна адхезия и преживяемост

Клетъчната адхезия играе съществена роля при всички етапи на туморното развитие. В настоящото изследване са тествани кратко - и дългоживущи ефекти върху клетъчната адхезия, дължащи се на електропермеабилзацията.

Колориметричният метод за оцветяване с кристал виолет е използван за количествено определяне на клетъчната адхезия, а MTS теста - за определяне на

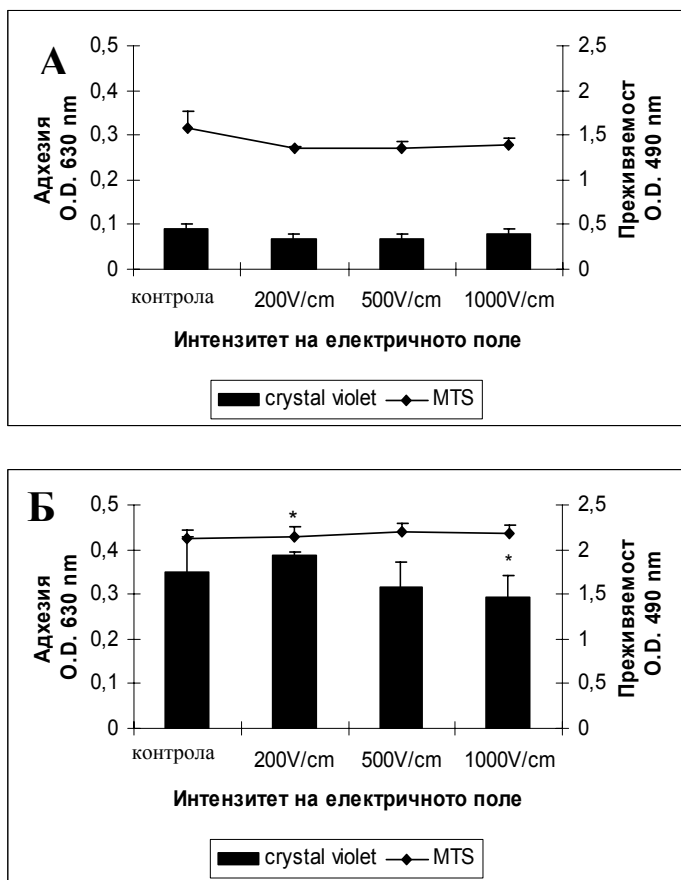
клетъчната преживяемост след електропермеабилзацията. Клетките са култивирани 24 часа преди електропорацията. На Фиг. 1.3. е показана клетъчната адхезия и преживяемост на електропорираните 3Т3 клетките след 2 часа (Фиг. 1.3.А) и 24 часа (Фиг. 1.3Б). Клетъчната адхезия на 3Т3 клетките не беше повлияна значително от електричното третиране (Фиг. 1.3.) през цялия период на изследване. Намаляване на клетъчната адхезия се наблюдава само при 1000V/cm 24 часа след електропорация в сравнение с тази при 200V/cm (Фиг. 1.3.Б). Пролиферацията на клетките не е повлияна след електропермеабилзацията, тъй като след 24 часа относителния брой (O.D. 630nm) на нетретираните и електропорираните клетки нараства между 30% - 40%. Незначително намаляване на клетъчната преживяемост при всички третиранни клетки се наблюдава 2 часа след електропорацията. Няма разлика в клетъчната преживяемост между третиранни и нетретиранни клетки 24 часа по-късно.

Инвазивната клетъчна линия MDA-MB-231 показва различно поведение при третиране с високоволтови електрични импулси (Фиг. 1.4.А и 1.4.Б) в сравнение с 3Т3 клетките. Добре е известно, че MDA-MB-231 клетките имат

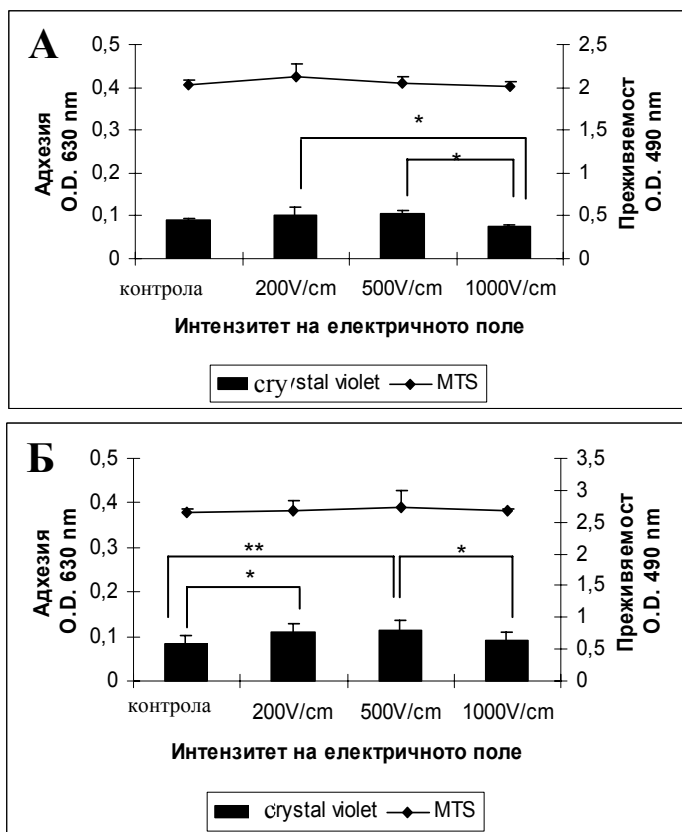
като цяло слабо адхезивно поведение [Wang A.T. et al., 2003]. Два часа след електрично третиране с висок интензитет на полето (1000V/cm) клетъчната адхезия значително намалява в сравнение с контролите и клетките, третирани с 200V/cm и 500V/cm (Фиг. 1.4.А). В същото време не се констатира намаляване в клетъчната преживяемост с нарастване на интензитета на електричните импулси (Фиг. 1.4.А). Изненадващо, дори 24 часа след електротретирането клетъчната адхезия при 200V/cm и 500V/cm показва известно увеличение и само адхезията при 1000V/cm намалява (Фиг. 1.4.Б). Клетъчната преживяемост 24 часа след третиране изглежда неповлияна от електропорацията.

Неинвазивната клетъчна линия MCF-7 показва основно тенденция към намаляване на клетъчната адхезия 2 часа след електропорацията (Фиг. 1.5.А). Адхезията става по-слаба с увеличаване интензитета на електричното поле и достига минимум при 1000V/cm (Фиг. 1.5.А). Тенденцията на клетъчната преживяемост при MCF-7 е бавно намаляване с повишаване интензитета на електричното поле. След 24 часа адхезията и преживяемостта остават неповлияни от електропорацията (Фиг. 1.5.Б). Констатираните от нас

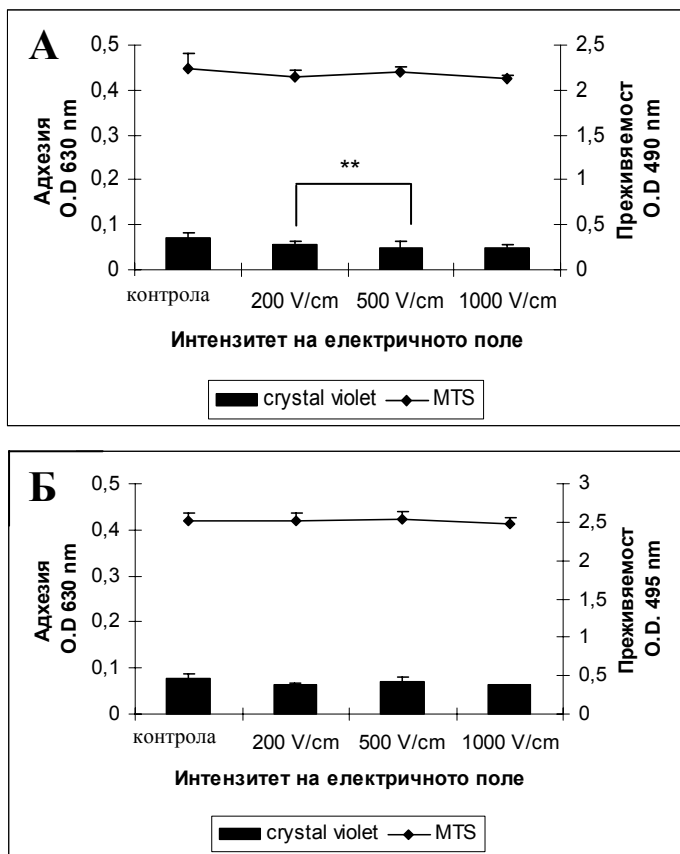
резултати са в съгласие с изследванията на Израели и Вайс [Yizraeli M.L. and Weihs D., 2011], които показват, че фибробластите не се повлияват значително от електричното третиране в сравнение с раковите клетки (MDA-MB-231). Като цяло, и при двете ракови линии електропермеабилзацията забавя клетъчната пролиферация, тъй като 24 часа по-късно няма значително увеличаване на относителния брой клетки. За разлика от Чемазар и колеги [Cemazar M. et al, 1998], които показват значително намаляване на преживяемостта на MCF-7 вследствие на третирането им с 200V/cm и 1000V/cm електрични импулси, нашите резултати не показват намаляване на клетъчната адхезия и преживяемост между горните стойности на интензитета на електричното поле. Най-вероятната причина за различията в резултатите произтичат от използваната клетъчна система: в нашите изследвания сме използвали адхезирални клетки, докато в работата на Чемазар и колеги [Cemazar M. et al, 1998] са използвани клетки в суспензия. От тук може да се направи извода, че адхезиралите клетки са по-нечувствителни към действието на електричното поле.



Фиг. 1.3. Адхезия и преживяемост на 3T3 клетки. Клетките са инкубирани 24 часа преди електропорацията. 2 часа (А) и 24 часа (В) след електротретирането е измерена клетъчната адхезия с кристал виолет тест и клетъчната преживяемост с MTS тест. Данните са на базата на 7 повторения от три последователни експеримента. Статистиката е направена с ANOVA one-way тест и Tukey–Kramer post тест (* $p < 0.05$).



Фиг. 1.4. Адхезия и преживяемост на MDA-MB-231 клетки. Клетките са инкубирани 24 часа преди електропорацията. 2 часа (A) и 24 часа (B) след електропретирането е измерена клетъчната адхезия с кристал виолет тест и клетъчната преживяемост с MTS тест. Данните са на базата на 7 повторения от три последователни експеримента. Статистиката е направена с ANOVA one-way тест и Tukey–Kramer post тест (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).



Фиг. 1.5. Адхезия и преживяемост на MCF-7 клетки. Клетките са инкубирани 24 часа преди електропорацията. 2 часа (А) и 24 часа (В) след електротретирането е измерена клетъчната адхезия с кристал виолет тест и клетъчната преживяемост с MTS тест. Данните са на базата на 7 повторения от три последователни експеримента. Статистиката е направена с ANOVA one-way тест и Tukey-Kramer post test (** $p < 0.01$).

1.3. Актинов цитоскелет

Актиновият цитоскелет играе фундаментална роля в клетъчната адхезия, миграция и растеж, както при много физиологични процеси, така и при патологични процеси като туморното развитие [Woodhouse E. et al., 1997]. Изследвано е влиянието на високоволтови електрични импулси върху организацията на актиновия цитоскелет при две клетъчни линии от рак на гърдата и една нетрансформирана клетъчна линия - 3Т3. Измененията в актиновия цитоскелет бяха проследени до 48-мия час след електротретирането, за да се установи колко стабилни са промените.

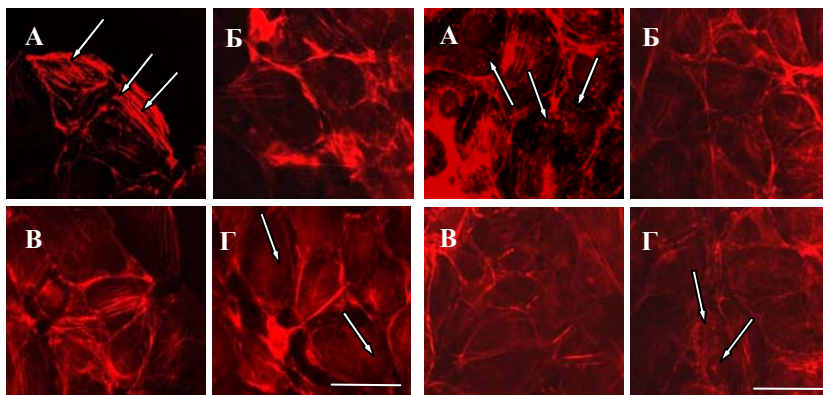
Преди електропорацията 3Т3 клетките показват типична морфология за фибробласти с добре изразени интактни актинови филаменти, образуващи стрес фибри по цялата клетъчна дължина (стрелки на Фиг. 1.6.А). След електропорацията с различен интензитет на полето се наблюдава промяна в организацията на цитоскелета (Фиг. 1.6.Б-Г) - актиновите филаменти (стрес фибри) намаляват по брой и изтъняват, като ефектът се засилва с увеличаване интензитета на полето. При 1000 V/cm клетъчният цитоскелет остава видим само в клетъчната периферия

(Фиг. 1.6.Г), като в същото време се наблюдава точкова актинова организация в клетъчната периферия (подозоми) (стрелки на Фиг. 1.6.Г). Тъй като подозомите са известни с тяхната протеолитична активност към ЕЦМ, можем да предположим, че прилагането на високоволтови електрични импулси подпомага деградацията на клетката. Основно резултатите показват редукция на клетъчната адхезия. Двадесет и четири часа след електротретиране се наблюдава отшумяване на ефекта на електричното поле, като най-бързо се възстановяват актиновите стрес фибри при клетки, третирани с 200V/cm (Фиг. 1.7.Б). Подозоми се наблюдават все още в клетъчната периферия при клетки, третирани с 1000V/cm (стрелки на Фиг. 1.7.Г), но те се появяват и при нетретирани клетки (стрелки на Фиг. 1.7.А). Вероятно на по-късен етап формирането на подозоми се инициира с изчерпването на серума от клетъчната среда с времето [Yamaguchi H. et al., 2005]. Процесът на възстановяване на интактния актинов цитоскелет 48 часа след електротретирането изглежда завършен при клетки, третирани с 200V/cm и 500V/cm (Фиг. 1.8.Б и Фиг. 1.8.В), докато актиновите стрес фибри в 3Т3 клетки, третирани с 1000V/cm остават тънки и бледи (Фиг. 1.8.Г). От така

изложените резултати може да се заключи, че влиянието на електропорацията върху актиновия цитоскелет на 3T3 клетки води до бързо, но временно нарушаване на актиновите филаменти, като процесът е зависим от интензитета на приложеното електрично поле. Нашите заключения се потвърждават и от проведени други изследвания относно влиянието на електропорацията (основно при по-ниски интензитети на полето - 200V/cm) върху разрушаването на цитоскелетната организация на нетрансформирани клетки като фибробласти [*Harkin D. and Hay E., 1996*] и ендотелни клетки [*Kanthou C. et al., 2006*]. За разлика от пълното възстановяване на цитоскелета при клетки, третирани с 200V/cm и 500V/cm, ние демонстрираме, че при използването на интензитет на полето, типичен за електро(химио)терапията - 1000V/cm, възстановяването на актиновия цитоскелет остава незавършено. Наблюдаваме за първи път увеличаване на протеолитичната активност на електропориранията клетка. Този процес има нужда да бъде допълнително изследван и проучен. Нарушаването на цитоскелета на адхерентните клетки води до промяна в прикрепянето на клетките, до намалено клетъчно придвижване и преживяемост.

Доминиращият тип стромални клетки, срещащи се във всеки тумор, е от фибробластен произход [*Sadlonova A. et al., 2005*]. Много изследвания, проведени *in vitro* и *in vivo* показват, че фибробластите играят важна роля при поддържане растежа на туморните клетки [*Kunz-Schughart L.A. and Knuechel R., 2002; Tyan S.W. et al., 2011; Orimo A. et al., 2005*]. Дестабилизирането на актиновия цитоскелет на фибробластите под действието на високоволтови електрични импулси би могло да доведе до един допълнителен положителен ефект от прилагането на електро(химио)терапията, водещ до ограничаване разпространението на тумора.

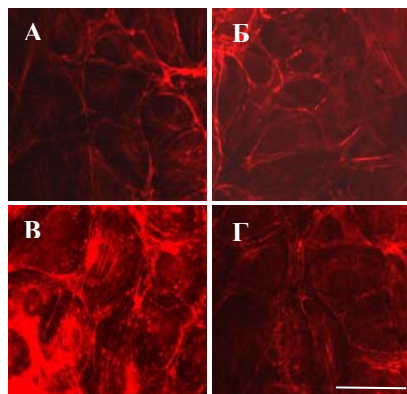
Електропорирането с 200V/cm и 500V/cm на високоинвазивната клетъчна линия от рак на гърдата MDA-MB-231 след два часа води до образуването на клетъчни агрегати и добре изразени актинови стрес фибри по клетъчната дължина (Фиг. 1.9.Б и 1.9.В). Образуването на клетъчни агрегати може да бъде последица от засилените клетка-клетка контакти, вследствие на увеличения калциев поток в клетката след електротретирането [*Cho M. et al., 1999; Sauer H. et al., 2002*].



Фиг. 1.6. 3Т3 клетки, инкубирани 2 часа след електропорация и оцветени за актин. (А) контрола, (Б) клетки електропорирани с 200V/cm, (В) с 500V/cm, (Г) с 1000V/cm. Барът е 50 μ m.

Фиг. 1.7. 3Т3 клетки, инкубирани 24 часа след електропорация и оцветени за актин. (А) контрола, (Б) клетки електропорирани с 200V/cm, (В) с 500V/cm, (Г) с 1000V/cm. Барът е 50 μ m.

В същото време електричните импулси с интензитет 1000V/cm не водят до формиране на агрегати (Фиг. 1.9.Г). Актиновият цитоскелет при контролните нетретиранни клетки и при клетки, третирани с 1000V/cm, е разположен периферно (Фиг. 1.9.А и 1.9.Б). Двадесет и четири часа по-късно клетките, третирани с 200V/cm и 500V/cm (Фиг. 1.10.Б и 1.10.В) показват стабилизиран актинови филаменти (стрес фибри по дължината на клетъчното тяло) и липса на клетъчни агрегати.

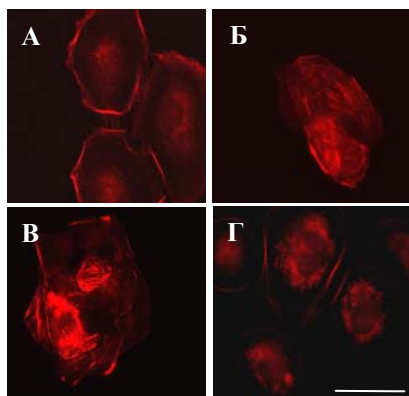


Фиг. 1.8. 3Т3 клетки, инкубирани 48 часа след електропорация и оцветени за актин. (А) контрола, (Б) клетки електропорирани с 200V/cm, (В) с 500V/cm, (Г) с 1000V/cm. Барът е 50μm.

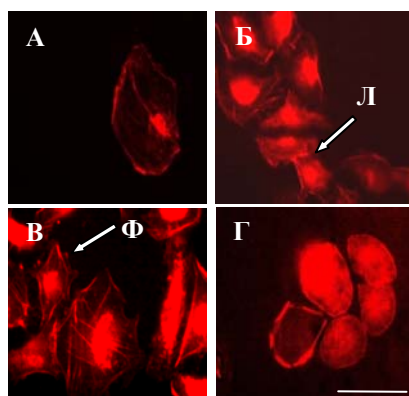
В същото време се наблюдават актинови структури като ламелоподи (стрелки на Фиг. 1.10.Б) и филоподи (стрелки на Фиг.1.10.В), свидетелстващи за наличие на адхезивен и миграционен потенциал на клетката. Клетките, третирани с 1000V/cm показват типична морфология за слабо адхерентни клетки: по-закръглени с не добре изразени актинови стрес фибри (Фиг.1.10.Г). Два дни след електропорацията присъствието на филоподи и ламелоподи е още по-силно изразено при клетки, третирани с 200V/cm и 500V/cm електрично поле (Фиг. 1.11.Б и 1.11.В). Тези актинови структури се появяват и при клетки третирани с 1000V/cm електрично поле (Фиг. 1.11.Г). Важно е да се отбележи, че според нови проучвания, едновременното

присъствие на двата вида актинови протрузии (ламелоподи и филоподи) в една клетка води до слаба подвижност и до клетъчен миграционен арест [*Understanding the migration of cancer cells* ^[*]]. Като цяло резултатите за MDA-MB-231 демонстрират тенденция за засилване на клетка–субстрат адхезията с времето основно при клетки, третирани с 200V/cm и 500V/cm електрично поле.

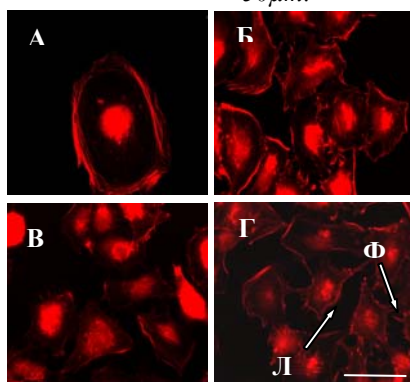
^[*] <http://www.sciencedaily.com/releases/2008/06/080623105027.htm>



Фиг. 1.9. MDA-MB-231 клетки инкубирани 2 часа след електропорация и оцветени за актин. (А) контрола, (Б) електропорирани с 200V/cm, (В) с 500V/cm, (Г) с 1000V/cm. Барът е 50μm.



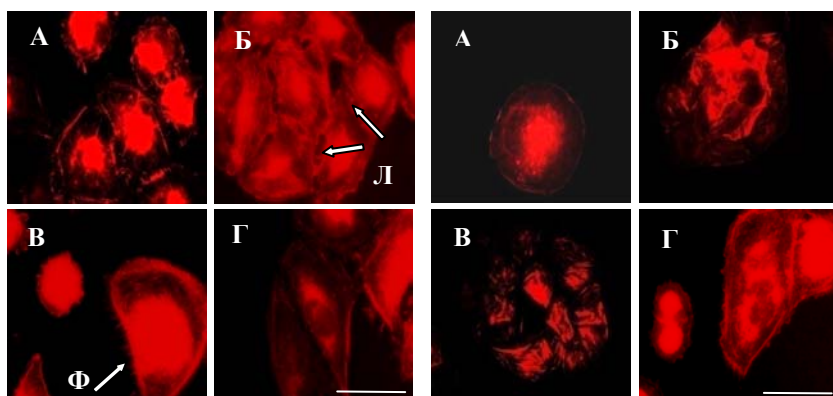
Фиг. 1.10. MDA-MB-231 клетки инкубирани 24 часа след електропорация и оцветени за актин. (А) контрола, (Б) електропорирани с 200V/cm, (В) с 500V/cm, (Г) с 1000V/cm. Л-ламелоподи, Ф-филоподи. Барът е 50μm.



Фиг. 1.11. MDA-MB-231 клетки инкубирани 48 часа след електропорация и оцветени за актин. (А) контрола, (Б) електропорирани с 200V/cm, (В) с 500V/cm, (Г) с 1000V/cm. Л-ламелоподи, Ф-филоподи. Барът е 50μm.

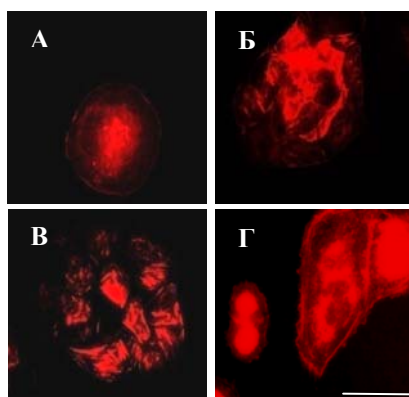
При третирането на MCF-7 клетки с електрични импулси (200V/cm – 1000V/cm) също се наблюдава промяна в актиновия цитоскелет (Фиг. 1.12.Б-Г). Клетките, третирани с 200V/cm , показват добре оформени актинови стрес фибри и клетъчни контакти, а така също и присъствие на ламелоподи и филоподи (Фиг. 1.12.Б). Клетките, третирани с 500V/cm показват също добре изразени филоподи (Фиг. 1.12.В), докато клетките, третирани с 1000V/cm (Фиг. 1.12.Г) демонстрират морфология най-близка до контролните клетки. Тенденцията на образуване на междуклетъчни контакти и клетъчни агрегати се проявява 24 часа след електропорация на клетки, третирани с 200V/cm и 500V/cm (Фиг. 1.13.Б и 1.13.В). След 48 часа процесът на образуване на агрегати (с наличие на междуклетъчни контакти) се запазва и се проявява при трите интензитета на приложеното електрично поле (Фиг. 1.14. Б-Г). Това дава основание да се предположи, че при електротретираните MCF-7 клетки преобладават междуклетъчните контакти за сметка на клетка-субстрат контактите. Като резултат клетките стават по-слабо прикрепени към субстрата след третирането с електрично поле. Като цяло електропорацията не предизвиква

значителни нарушения в актиновия цитоскелет при ракови клетки. Добре видими актинови стрес фибри, както и ламелоподи и филоподи се наблюдават в електропорирани ракови клетки главно при по-ниските и средни интензитети на полето. Запазването на актиновия цитоскелет след прилагането на електрично поле, колкото и изненадващо да звучи, може да бъде причина за провокиране на клетъчна смърт на по-късен етап, както констатира Ксиао и колеги [*Xiao D. et al., 2011*]. Това явно се дължи на факта, че запускането на апоптоза под действието на електрично поле е свързано със сигналните пътища, свързани с актиновия цитоскелет.



Фиг. 1.12. MCF-7 клетки инкубировани 2 часа след електропорация и оцветени за актин. (А) контрола, (Б) електропорирани с 200V/cm, (В) с 500V/cm, (Г) с 1000V/cm, Л-ламеллоподи, Ф-филоподи. Барът е 50μm.

Фиг. 1.13. MCF-7 клетки инкубировани 24 часа след електропорация и оцветени за актин. (А) контрола, (Б) електропорирани с 200V/cm, (В) с 500V/cm, (Г) с 1000V/cm. Барът е 50μm.



Фиг. 1.14. MCF-7 клетки инкубировани 48 часа след електропорация и оцветени за актин. (А) контрола, (Б) електропорирани с 200V/cm, (В) с 500V/cm, (Г) с 1000V/cm. Барът е 50μm.

На базата на получените резултати може да се обобщи, че видът на клетъчната адхезия (клетка-субстрат или клетка-клетка адхезия), предизвикан от електропорацията е клетъчно специфичен. При MDA-MB-231 клетки преобладават клетка-субстрат адхезионните контакти, докато при електротретираните MCF-7 клетки са по-изразени клетка-клетка контактите. Както и други изследователи [Wang F. et al., 2002] са установили, този факт може да се дължи на участието на различни сигнални пътища и сигнални молекули в процеса на клетъчната адхезия. Използвайки различни сигнални инхибитори Ванг и колеги [Wang F. et al., 2002] описват способността на инвазивните и метастатични клетки от рак на гърдата (MDA-MB-231 и MCF-7) или да се възвръщат към почти нормален фенотип, или да претърпяват клетъчна смърт. Въз основа на получените резултати, можем да предположим, че прилагането на високоволтови електрични импулси към трансформираната MDA-MB-231 клетъчна линия може да доведе до регресия към по-малко инвазивен или нетрансформиран клетъчен фенотип, тъй като укрепването на клетка-субстрат контактите води до намаляване

подвижността на клетките и инвазивността им [Bakin A. et al., 2004].

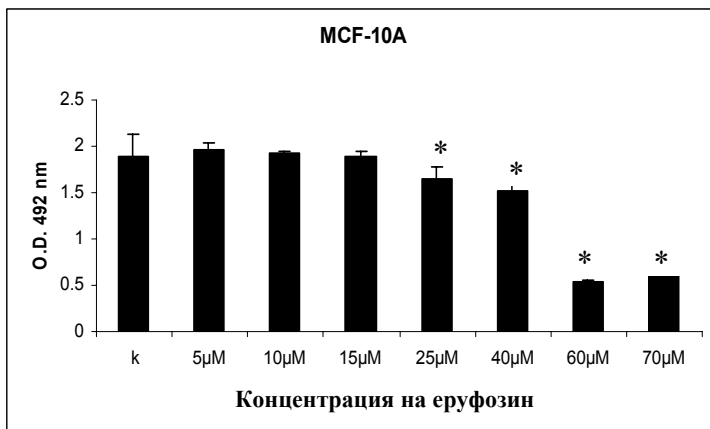
Също така, в MCF-7 клетките се наблюдава изменение в клетъчната адхезия и фенотипа на клетките, но промените са свързани с намаляване на клетка-субстрат контактите и увеличаване на способността на електропорираните клетки да формират стабилни клетъчни агрегати и клетка-клетка контакти. Може да се предположи, че тази тенденция може да доведе до формирането на клетъчен фенотип с намалена клетъчната подвижност и инвазивност.

2. Влияние на еруфозин върху клетъчното поведение

2.1. Клетъчна преживяемост и цитотоксичност

Изследвани са две ракови линии MCF-7 и MDA-MB-231 и нетуморогенната епителна линия MCF-10A. Използван е MTS тест за опреляне на клетъчната преживяемост след третиране с еруфозин. Условиата на култивиране са описани в раздел 1. За третиране на клетъчните линии е избран концентрационен диапазон на еруфозина, в който е показано, че не се наблюдава понижаване на пролиферативната активност на

нетуморогенната епителна клетъчна линия MCF-10 (Фиг.2.1.)

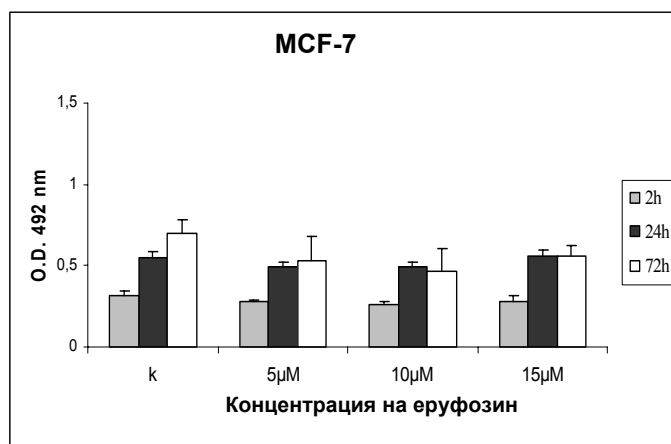
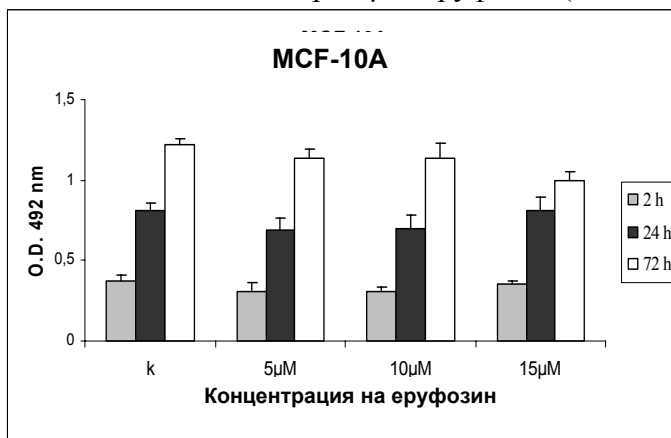


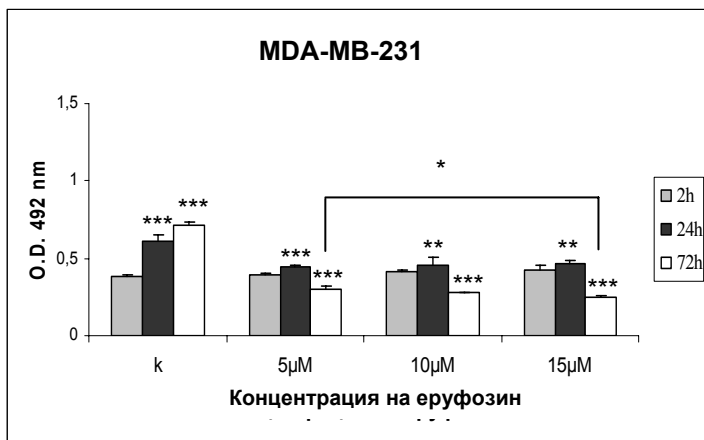
Фиг. 2.1. Проллиферативна активност на MCF-10A третиранни с еруфозин. Статистиката е направена с ANOVA one-way test и Tukey–Kramer post ($* p < 0.1$, $** p < 0.01$).

Клетъчната преживяемост на трите адхерентни клетъчни линии не беше повлияна 2 часа след третиране с еруфозин в концентрации 5µM, 10µM и 15µM (Фиг. 2.2.).

Нетуморогенните епителни клетки MCF-10A остават неповлияни и при по-дълъг период на третиране с лекарството (24 и 72 часа) (Фиг. 2.2.). При MCF -7 се наблюдава по-бавна пролиферативна активност след 72 часа при третиране с 5µM еруфозин. Инвазивната клетъчна

линия MDA-MB-231 е най-чувствителна към действието на еруфозина. Пролиферативната клетъчна активност се редуцира още на 24-тия час след третиране с 5 μ M и по-високи концентрации на еруфозин (10 μ M и 15 μ M). След 72 часа IC₅₀ се достига още при 5 μ M еруфозин (Фиг. 2.2.).





Фиг. 2.2. Клетъчна преживяемост и пролиферация на клетки третирани с различни концентрации на еруфозин за 2, 24 и 72 часа. Статистиката е направена с ANOVA one-way test и Tukey-Kramer post test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Еруфозинът показва висока антипролиферативна активност при клетъчни линии от рак на гърдата в концентрации, които не са токсични за адхерентни нетуморогенни клетъчни линии от тъкан на гърдата (Фиг. 2.1.). Трябва де се отбележи, че тройно негативната клетъчна линия MDA-MB-231 (ER-, PR-, HER2-) има пълен отговор към действието на еруфозина, отколкото хормон-зависимата клетъчна линия MCF-7. Високата антинеопластична активност на еруфозина в клетъчните линии от рак на гърдата, заедно с липсата на токсичност при нетуморогенните MCF-10A клетки, съответства на

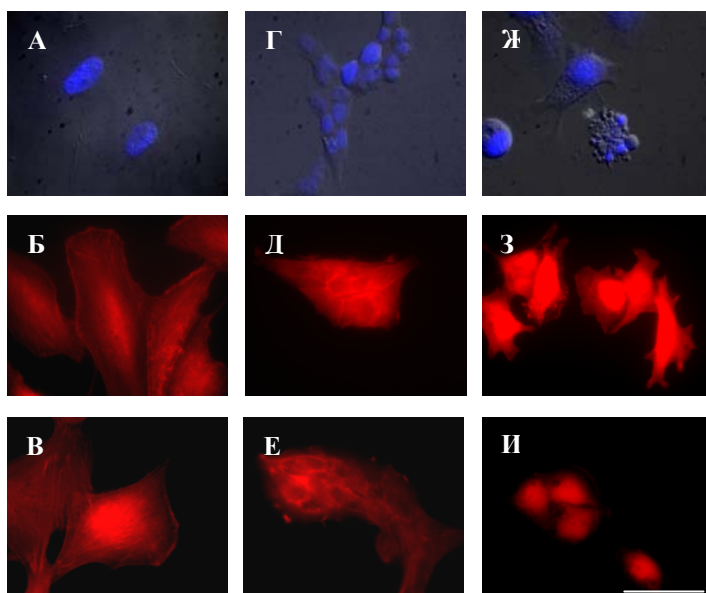
опита с мителфозин. Мителфозинът е първият алкилфосфохолин, който успешно се използва за лечение на кожни метастази от рак на гърдата и неговият значителен ефект след локално приложение е свързан с добрата поносимост към него на нормалните кожни клетки [Unger C. et al., 1992]. В допълнение, еруфозинът е не само лишен от токсичност към нормалните хемопоеични клетки, но дори стимулира образуване на колонии на клетки от човешки костен мозък [Yosifov D. et al., 2011].

2.2. Реорганизация на цитоскелета и индукция на клетъчна смърт

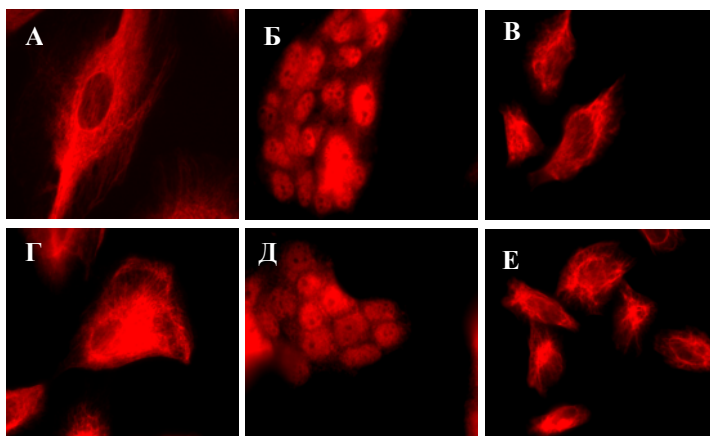
При третирането на MDA-MB-231 с 15 μ M еруфозин се наблюдава свиване на ядрото, хроматинова кондензация и фрагментация на ядрото (Фиг. 2.3.Ж). За разлика от MDA-MB-231, ядрата на MCF-10A и MCF-7 не претърпяват забележими промени при третиране със същата концентрация на лекарството (Фиг. 2.3.А и 2.3.Г). При проследяване адхезивното поведение на MDA-MB-231 се забелязва, че същата концентрация на еруфозина (15 μ M), причиняваща апоптоза (Фиг. 2.3.Ж), провокира засилена

адхезия и клетъчно разстилане, както и появата на актинови структури като ламелоподи и филоподи върху клетъчната повърхност (Фиг. 2.3.3.). При другите две клетъчни линии MCF-10A и MCF-7 не се наблюдава промяна в адхезивното поведение след третиране с еруфозин (Фиг. 2.3.Б и 2.3.Д). Реорганизацията на актиновия цитоскелет при MDA-MB-231 клетки след третиране с еруфозин е свързано и с индукция на апоптоза. Подобна тенденция към формирането на адхерентен клетъчен фенотип в отговор на действието на еруфозина се наблюдава и при LAMA-84 хронични миелоидни клетки [Konstantinov S.M. et al., 1999]. За разлика от клетките, използвани в нашето изследване, LAMA-84 клетките показват сравнително висока устойчивост срещу еруфозина (IC_{50} -21-91 μ M). Може да се предположи, че силно инвазивната клетъчна линия MDA-MB-231 е засегната двойно от действието на еруфозина. От една страна, тя е повлияна от намесата на еруфозина в специфичните сигнални пътища, свързани с *ras* и *raf* онкогени [Dineva I. K et al., 2012], които често са мутирали в туморните клетки. От друга страна, влиянието на еруфозина върху актиновата реорганизация ще повлияе туморната миграция, тъй като актин свързващите протеини на Rho

фамилията на малките GTP-ази, също ще бъдат засегнати [Jiang P. et al., 2009]. Третирането на клетките с 15 μ M еруфозин не води до промени в микротубулната цитоскелетна мрежа (Фиг. 2.4.). При нетретираните (контрола) MCF-10A клетки тя е представена като добре оформени нишки, излизаци от ядрото и пръснати по цялата клетъчна дължина (Фиг. 2.4.A). Същото поведение се наблюдава и при клетки, третирани с еруфозин (Фиг. 2.4.Г). При MCF-7 и MDA-MB-231 тубулиновата мрежа е по-дифузна, но не се наблюдава разрушаване при третиране с лекарството (Фиг. 2.4). Липсата на промени в тубулиновата мрежа подкрепя разбирането, че микротубулите не участват в трафика на еруфозин в клетките, нито са мишена за действието на лекарството.



Фиг. 2.3. *Ефект на еруфозина върху клетъчното ядро и актиновия цитоскелет. MCF-10A (А, Б, В), MCF-7 (Г, Д, Е) и MDA-MB-231 (Ж, З, И) третирани с 15 μ M еруфозин и оцветени с DAPI (горен панел) и BODIPY/Phalloidin (среден панел). Долен панел – оцветяване за актин на нетретирани клетки. Барът е 50 μ m.*



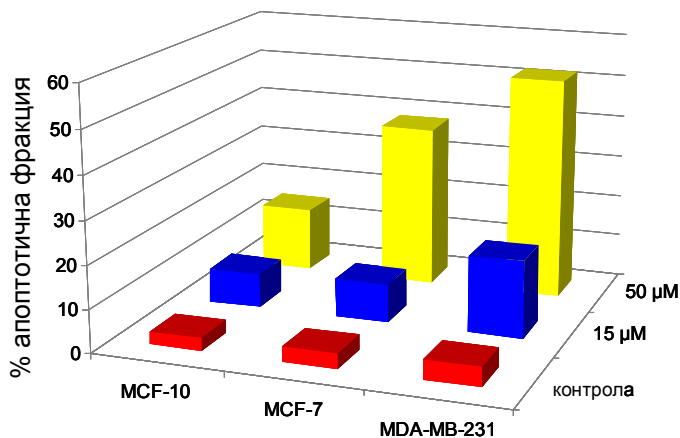
Фиг. 2.4. Ефект на еруфозина върху тубулиновата организация. MCF-10A (А), MCF-7 (Б) и MDA-MB-231 (В) третирани с 15 μ M еруфозин и оцветени за α -тубулин. Долен панел- нетретирани MCF-10A (Г), MCF-7 (Д) and MDA-MB-21 (Е). Барът е 50 μ m.

2.3. Флоуцитометрия

За определяне на количеството на апоптотичните клетки е направен анализ чрез поточна цитометрия на тестваните клетъчни линии след третиране с еруфозин. Данните са сравнени с нетретирани контролни клетки (Фиг. 2.5.). При контролите и на трите клетъчни линии фазата на апоптотичните клетки (Sub G1) е в порядъка от 3-4% (Фиг. 2.5.). Анализът на MCF-10A след третиране с 15 μ M еруфозин показва слабо покачване на броя

апоптотични клетки (Sub G1) на 8%, а при увеличаване концентрацията на еруфозина на 50 μ M, апоптотичната фракция възлиза на 15% (Фиг. 2.5.). При MCF-7 третирането с 15 μ M еруфозин води до 9% апоптотична фаза. При по-високата концентрация на еруфозин (50 μ M) този процент се увеличава и достига 38% (Фиг. 2.5.). За разлика от MCF-7, MDA-MB-231 клетките показват по-голяма чувствителност към по-ниската концентрация на еруфозина - 15 μ M (18% апоптотични клетки). При покачване на концентрацията на лекарството на 50 μ M, процентът на апоптотичните клетки значително нараства - 52% (Фиг. 2.5.). Тези данни потвърждават нашите микроскопски наблюдения върху запускането на апоптотични процеси (Фиг. 2.3.A, Г, Ж), че нетрансформираните MCF-10A и слабо инвазивната клетъчна линия MCF-7 са незначително повлияни от действието на лекарството при ниските концентрации на еруфозина (15 μ M). За разлика от тях MDA-MB-231 клетките отново показват най-висока чувствителност към еруфозина. Това потвърждава извода, че еруфозинът може да се приложи като ефективен и селективен антитуморен

агент с незначителен ефект върху нормалната неракова тъкан заобикаляща тумора.



Фиг. 2.5 *Определяне броя апоптотични клетки чрез поточна цитометрия. Клетките са оцветени с пропидиев йодид и обработени с FACS анализ. Процентът на апоптотичните клетки е идентифициран с WINMDI софтуер.*

3. Влияние на еруфозин и електрично поле върху клетъчното поведение

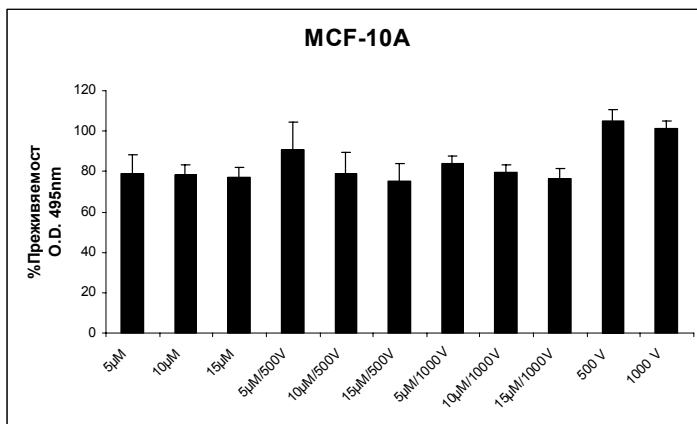
За да тестваме синергичния ефект на високоволтово електрично поле (електропорация) върху активността на анти tumorното лекарство еруфозин, проведохме

експерименти, при които клетките бяха третирани в комбинация от електрично поле и еруфозин.

3.1. Клетъчна преживяемост и цитотоксичност

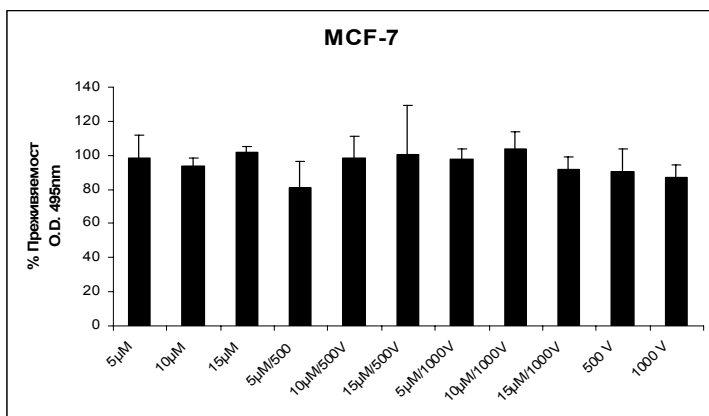
MCF-10A, MCF-7 и MDA-MB-231 клетъчни линии са третирани с 5 μ M, 10 μ M и 15 μ M еруфозин, самостоятелно и в комбинация с приложено електрично поле с интензитети 500V/cm и 1000V/cm за 24 часа. Резултатите за клетъчната преживяемост на трите адхерентни клетъчни линии са нормализирани спрямо нетретираните контроли за всяка клетъчна линия и са представени на Фиг. 3.1., 3.2., и 3.3.

Нетуморогенната клетъчна линия MCF-10 (Фиг. 3.1.) не показва разлика в преживяемостта на клетките, третирани с различни концентрации на еруфозин, като преживяемостта е в порядъка от 80-85% спрямо контролата (нетретираните клетки). Само клетките, третирани с електрично поле показват преживяемост, близка до тази на контролата (близо до 100%). Не се наблюдава разлика в преживяемостта на клетките, третирани едновременно с еруфозин и електрично поле спрямо тази при клетки, третирани само с еруфозин.



Фиг. 3.1. Пролиферативна активност на MCF-10 клетки третиранни с 5μM, 10μM и 15μM еруфозин самостоятелно и в комбинация с електрично поле с интензитет 500V/cm и 1000V/cm. Посоченият волтаж отговаря на интензитета във V/cm.

При MCF -7 (Фиг. 3.2.) не се наблюдава изменение в преживяемостта на клетките в зависимост от вида на третирането. Всички третиранни клетки запазват преживяемост между 85-95% спрямо контролата.

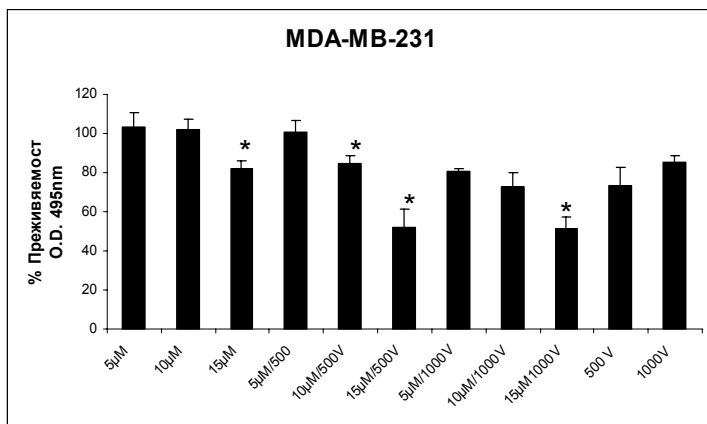


Фиг. 3.2. Пролиферативна активност на MCF-7 клетки третирани с 5µM, 10µM и 15µM еруфозин самостоятелно и в комбинация с електрично поле с интензитет 500V/cm и 1000V/cm. Данните са на базата на 6 повторения от три последователни експеримента. Посоченият волтаж отговаря на интензитета във V/cm.

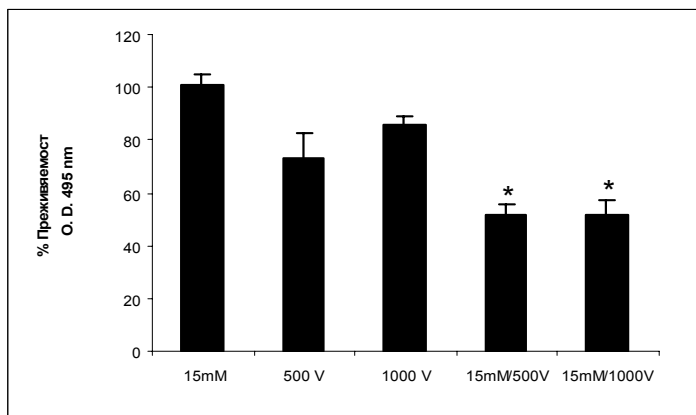
Инвазивната клетъчна линия MDA-MB-231 показва концентрационно зависимо намаляване на преживяемостта, както при самостоятелното използване на еруфозин, така и в комбинация с приложено електрично поле (Фиг. 3.3.).

Най-чувствително редуциране на пролиферативната активност се наблюдава при комбинираното третиране на MDA-MB-231 с 15µM еруфозин и електрично поле с интензитет 500V/cm и 1000V/cm (Фиг. 3.4.). Прилагането на 15µM еруфозин и електрично поле самостоятелно довежда

до клетъчна преживяемост от 80% спрямо контролата. Но при едновременното прилагане на 15 μ M еруфозин и електрично поле се наблюдава рязко намаляване на пролиферативната активност на 50% (IC₅₀).



Фиг. 3.3. Пролиферативна активност на MDA-MB-231 клетки третирани с 5 μ M, 10 μ M и 15 μ M еруфозин самостоятелно и в комбинация с електрично поле с интензитет 500V/cm и 1000V/cm. Данните са на базата на 6 повторения от три последователни експеримента. Статистиката е направена с ANOVA one-way test и Tukey–Kramer пост тесст (** $p < 0.01$). Посоченият волтаж отговаря на интензитета във V/cm.

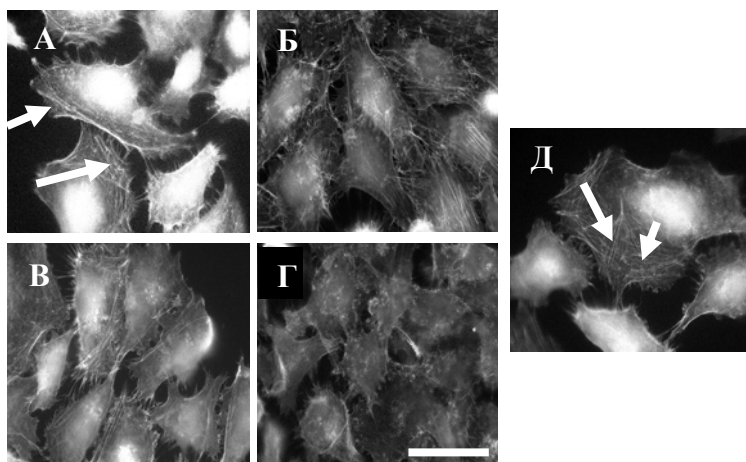


Фиг. 3.4. Пролиферативна активност на MDA-MB-231 клетки третирани с 15μM еруфозин самостоятелно и в комбинация с електрично поле с интензитет 500V/cm и 1000V/cm. Данните са на базата на 6 повторения от три последователни експеримента. Статистиката е направена с ANOVA one-way test и Tukey–Kramer пост тесст (** $p < 0.01$). Посоченият волтаж отговаря на интензитета във V/cm.

3.2. Реоорганизация на цитоскелет и индуциране на клетъчна смърт

След 24 часа инкубация с еруфозин в комбинация с електрично поле, клетките са оцветени за актин с BODIPY 558/568 Phalloidin и се анализират с флуоресцентен микроскоп. Получените резултати са представени на Фиг. 3.5. Установена е промяна само в цитоскелета на инвазивната клетъчна линия MDA-MB-231 след

комбинираното действие на лекарство и електрично поле. С прилагането на високоволтово електрично поле (1000V/cm) в комбинация с еруфозин се наблюдава тенденция на разрушаване на актиновите филаменти (Фиг. 3.5.Б, В, Г). Докато при контролни клетки (Фиг. 3.5.Д) и клетки третирани само с електрично поле (Фиг. 3.5. А) се визуализират добре оформени стрес фибри (стрелки на Фиг. 3.5.А и Д), разположени по дължината на клетъчното тяло, то при едновременното третиране на клетките с електрично поле и еруфозин се наблюдава деполимеризиране на актиновите филаменти и дифузното им разпределение в клетката дори и при ниски концентрации на еруфозин - 5 μ M (Фиг. 3.5.Б, В и Г). Това изменение в организацията на актиновия цитоскелет води до слаба клетъчна адхезия и е най-вероятната причина за намалената (50%) клетъчна преживяемост, констатирана на Фиг. 3.4.



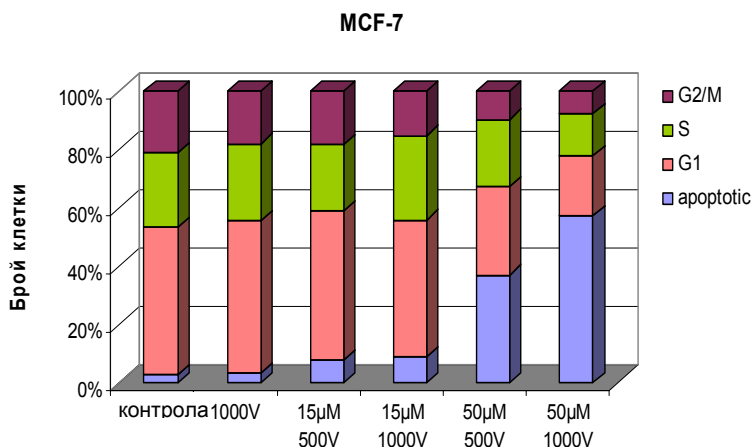
Фиг. 3.5. Ефект на еруфозин/електрично поле върху актиновия цитоскелет на MDA-MB-231. 1000V/cm (А), 5μM/1000V/cm (Б), 10μM/1000V/cm (В), 15μM/1000V/cm (Г), и контрола (Д). Барът е 50μm.

3.3. Флоуцитометрия

Клетките се третират с 15μM и 50μM еруфозин и съответно 500V/cm или 1000V/cm електрично поле и се инкубират за 24 часа. За определяне на количеството на клетките в различните фази на клетъчния цикъл е направен анализ чрез флоуцитометрия на тестваните клетъчни линии. Данните са сравнени с нетретираните контролни клетки (Фиг. 3.6. и 3.7.). Изследвани са двете ракови клетъчни

линии, тъй като само те показаха забележим ефект от действието на еруфозина (Фиг. 2.5.).

На Фиг. 3.6. е показан жизнения цикъл на MCF-7, третирани самостоятелно с еруфозин, и в комбинация с електрично поле. Sub-G1 популация (апоптотични клетки) се наблюдава при третиране на MCF-7 клетките с еруфозин самостоятелно и в комбинация с електрично поле (Фиг. 3.6.). FACS анализът в контролните клетки и клетките, третирани с 1000V/cm показва 1% Sub-G1 популация на клетки с хипо-диплоидно ДНК съдържимо.

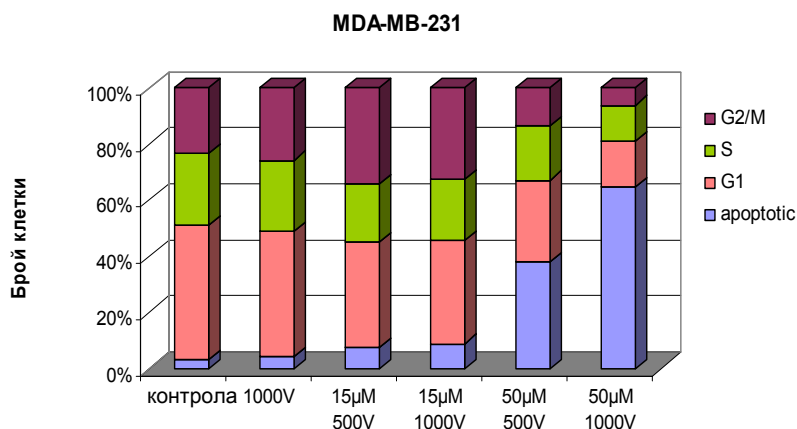


Фиг. 3.6. Влияние на еруфозин и електрично поле върху клетъчен цикъл на MCF-7. Резултатите са обединени от 3 проведени експеримента. Посоченият волтаж отговаря на интензитета във V/cm.

При клетките, третирани с 15 μ M еруфозин и 500V/cm или 1000V/cm електрично поле апоптотичната популация възлиза на 10-15%. Много чувствително нараства тази фаза при клетки, третирани с 50 μ M еруфозин и 500V/cm електрично поле – около 30%. А при 50 μ M еруфозин и 1000V/cm електрично поле повече от половината клетки (60%) се намират в апоптотична (sub G1) фаза.

При третиране на MDA-MB-231 с еруфозин, самостоятелно и в комбинация с електрично поле, се наблюдава същата тенденция на нарастване на Sub-G1 фазата при комбинираното прилагане на лекарството и електричното поле (Фиг. 3.7.). Интересното тук е същественото увеличаване на G2/M популацията при прилагането на 15 μ M еруфозин и електрично поле (500V/cm или 1000V/cm). Докато при контролните клетки и клетки, третирани само с 1000V/cm електрично поле клетъчната популация в G2/M възлиза на 25-30%, то при клетки, третирани с 15 μ M еруфозин и електрично поле размерът на тази популация се покачва до 40% (Фиг. 3.7.). При третирането на клетките с високи дози еруфозин

(50 μ M) и електрично поле (Фиг. 3.7.) относителният дял на G2/M фазата пада до 10-15% най-вероятно поради нарастващата част на апоптотични клетки (60% при клетки третиран с 15 μ M и 1000V/cm електрично поле).



Фиг. 3.7. Влияние на еруфозин и електрично поле върху клетъчен цикъл на MDA-MB-231. Резултатите са обединени от 3 проведени експеримента. Посоченият волтаж отговаря на интензитета във V/cm.

Увеличаването на G2/M фазата при комбинираното третиране на MDA-MB-231 с 15 μ M еруфозин и електрично поле може да бъде обяснено с възникване на клетъчен арест поради нарушаване най-вероятно на регулатора между G2 и

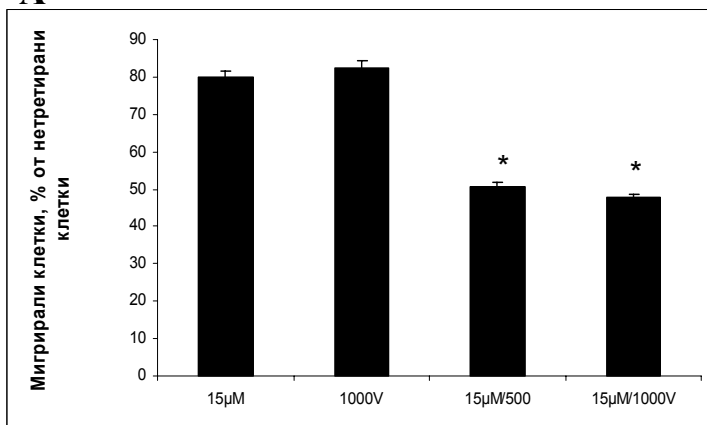
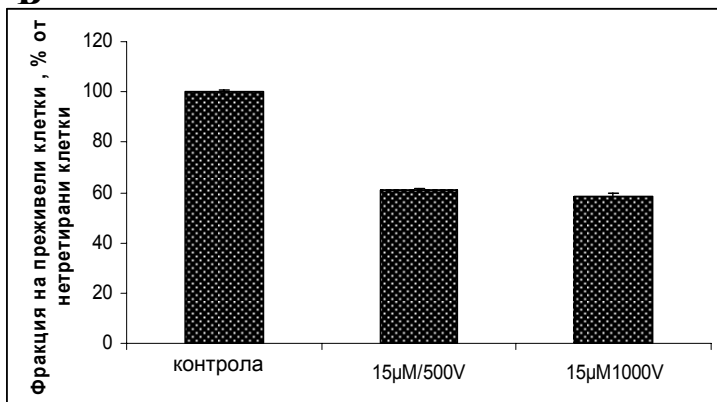
М фазата и възникването на т. нар. митотична катастрофа и формирането на огромни (giant) клетки [Erenpreisa J.A. and Cragg M.S., 2001]. Това би обяснило задържането на повече клетки в тази фаза и увеличението ѝ относителен дял. Съществуват изследвания, според които митотична катастрофа може да бъде предизвикана от различни антиракови лекарства, причиняващи промени в цитоскелета, най-вече β -тубулинова дестабилизация [McIntosh J.R., 1984], както и от йонизиращи лъчения [Glucksmann A. and Spear F.G., 1941] и други химични и физични агенти [Mansilla S. et al., 2006]. Като резултат, ядрената организация се нарушава, и на по-късен етап клетката навлиза в процес на клетъчна смърт [Roninson I.B., et al., 2001]. Нашите изследвания за първи път демонстрират комбинираното влияние на еруфозина и приложеното електрично поле върху клетъчния цикъл на MDA-MB-231. Тези пилотни изследвания са много обнадеждаващи и дават основание за бъдещи изследвания, свързани с изясняване на точния механизъм за възникване на митотичен арест под действието на еруфозин и електрично поле при високометастатичната клетъчна линия MDA-MB-231.

3.4. Клетъчна миграция

MCF -7 и MDA-MB-231 клетки бяха изложени на въздействието на електрично поле (500V/cm и 1000V/cm) и еруфозин (15 μ M) за 5 часа и беше определена тяхната миграция към отделението на миграционната система, съдържащо FCS. Миграционно поведение показаха само MDA-MB-231. Миграционното ниво на третираните клетки само с еруфозин или само с електрично поле (1000V/cm) е в порядъка на 80% спрямо нетретираната контрола (Фиг. 3.8.А). При комбинираното третиране на клетките с еруфозин и електрично поле (500V/cm или 1000V/cm) миграционното ниво на клетките рязко пада на 50% спрямо нетретираната контрола. Жизнеспособността на клетките, останали върху горната страна на полупропускливата мембрана (немигрирали клетки) беше определена чрез MTS тест за клетъчна пролиферация. Клетките, третирани с 15 μ M еруфозин и електрично поле показаха занижена жизнеспособност (50% спрямо нетретирана контрола, Фиг. 3.8.Б), което е и най-вероятната причина за спада в миграционния им потенциал. В настоящето изследване за първи път е демонстрирана засилената миграционно-инхибираща активност на еруфозина в комбинация с

приложено електрично поле. Миграцията на инвазивната клетъчна линия от рак на гърдата MDA-MB-231 след третирането ѝ с еруфозин и електрично поле беше силно редуцирана за разлика от миграцията на клетки, третирани само с еруфозин (15 μ M). За разлика от установеното от нас слабо влияние на еруфозина (приложен самостоятелно) върху миграционния потенциал на MDA-MB-231 клетки (80% миграционен потенциал, Фиг. 3.8.A), Йосифов и колеги [Yosifov D. et al., 2011] демонстрират намален миграционен потенциал на полимиеломни клетъчни линии (RPMI-8226, OPM-2 и U-266) под въздействието на 5 μ M - 15 μ M еруфозин с повече от 50%.

Нашето изследване потвърждава изследванията при OPM-2 и U-266 полимиеломни клетъчни линии [Yosifov D. et al., 2011], които показват, че намалената миграция се дължи на ниската клетъчна преживяемост.

А**Б**

Фиг.3.8. Ефект на еруфозин и електрично поле върху клетъчната миграция на MDA-MB-231. Време за мигриране - 12 ч. А. Мигриращите клетки са представени като процент от нетретираната контрола. **Б.** Тест за клетъчна виталност на немигриралите клетки върху горната част на миграционната система. Всички данни са осреднените стойности от два проведени експеримента. Статистиката е направена с ANOVA one-way test и Tukey-Kramer пост тест (** $p < 0.01$). Посоченият волтаж отговаря на интензитета във V/cm.

От експерименталните резултати, посочени в глава 3 се вижда, че действието на еруфузина в комбинацията с електрични импулси е най-ярко изразено при инвазивната клетъчна линия MDA-MB-231. Нашите експерименти се съгласуват с експериментите на Константинов и съавтори [*Konstantinov S.M. et al., 1998*], които показват че най-чувствителни на терапевтичния ефект на еруфузина са злокачествените левкемични линии като HL-60, K-562, Reh, MOLT-4, Jurkat, Ramos и Raji. Що се отнася до мястото на действие на алкилхосфохолина би могло да се предположи, че това е свързано с реорганизация на сигналните молекули, включени в апоптозата. Гажате и Молинедо [*Gajate C. and Mollinedo F., 2001*] в статията си в списание Blood през 2001 и серия от статии по-късно [*Gajate C., et al., 2004; Gajate C. and Mollinedo F., 2005*] доказват, че мястото на действие на друг вид алкилфосфохолин (еделфозин) са липидните рафтове. Синергичният ефект на електричното поле в комбинация с еруфозин предполага, че мястото на действие на електричните импулси е ръба на липидния рафт, тъй като това място е най-енергетично нестабилно.

Обобщение

Ракът на гърдата е на едно от първите места сред онкологичните заболявания по разпространение и смъртност в света. Това налага търсенето на по-ефективни антитуморни агенти и комбинирани подходи при антитуморната терапия на това заболяване. Актиновият цитоскелет е ключов фактор във всички етапи на туморното развитие - от неговото възникване до образуването на метастази, и поради тази причина би могъл да играе съществена роля както като прогностичен маркер, така и като мишена при антитуморната терапия.

В настоящата работа ние изследвахме въздействието на високоволтовите електрични импулси (използвани в електро(химио)терапията) и на новия антитуморен агент еруфозин върху *in vitro* клетъчен модел на рак на гърдата. Този модел включва високометастатичната ракова клетъчна линия MDA-MB-231, неинвазивната ракова клетъчна линия MCF-7 и нераковата клетъчна линия от млечна жлеза MCF-10A. В изследването е включена и фибробластната клетъчна линия 3T3, тъй като доминиращия тип стромални клетки, срещащи се във всеки тумор е от фибробластен произход и

тези клетки играят съществена роля при поддържане на растежа на туморната маса. Бяха проследени ефектите на приложеното електрично поле и еруфозина върху адхезивното поведение на клетките от клетъчния модел, както и ролята на актиновия цитоскелет в клетъчната миграция и клетъчната смърт индуцирани от горните фактори.

Установихме, че влиянието на електричното поле върху актиновия цитоскелет е клетъчно специфично и зависи от интензитета на приложеното електрично поле. Високомета статичната линия MDA-MB-231 (конституивно слабо адхезивна), реагира на приложеното електрично поле с увеличаване на клетъчната адхезия при 200 V/cm и 500 V/cm, засилване на клетка-ЕЦМ контактите и предизвикване на клетъчен миграционен арест (едновременното образуване на актинови протрузии като ламелоподи и филоподи). Въз основа на това, можем да предположим, че прилагането на високоволтови електрични импулси към трансформираната MDA-MB-231 клетъчна линия може да доведе до регресия към по-малко инвазивен (адхезивен) клетъчен фенотип, тъй като укрепването на

клетка-субстрат контактите води до намаляване подвижността на клетките и инвазивността им.

При неинвазивната ракова клетъчна линия MCF-7 клетъчната адхезия плавно намалява с нарастване на интензитета на приложеното електрично поле от 200 V/cm до 1000 V/cm, в резултат на което се наблюдават засилени клетка-клетка контакти (клетъчни агрегати). Предполага се, че тази тенденция може да доведе до формирането на клетъчен фенотип с намалена клетъчната подвижност.

От получените резултати можем да предположим, че електропорацията придобива нов анти-туморен ефект, който води до промяна на актиновия цитоскелет, намалена подвижност и инвазивност на трансформираните клетки.

Влиянието на електричното поле върху фибробластните клетки се изразява във временно и частично разрушаване на актиновия цитоскелет, като това е най-ярко изразено при високите интензитети на полето (1000 V/cm). Дестабилизирането на актиновия цитоскелет на фибробластите по действието на високоволтови електрични импулси би могло да доведе до един допълнителен положителен ефект от прилагането на

електро(химио)терапията, водещ до ограничаване на разпространението на тумора.

Влиянието на самостоятелно приложения еруфозин върху клетъчния модел е клетъчно и концентрационно зависимо. Той показва висока антипролиферативна активност спрямо инвазивната клетъчна линия MDA-MB-231 в концентрации, които не са токсични за нетуморогенната линия MCF-10A. Засиленият токсичен ефект на еруфозина към MDA-MB-231 се съпровожда с индукция на адхерентен клетъчен фенотип (засилена адхезия и клетъчно разстилане, ламелоподи и филоподи върху клетъчната повърхност) и запускане на апоптоза. Може да се предположи, че силно инвазивната клетъчна линия MDA-MB-231 е засегната двойно от действието на еруфозина. От една страна, тя е повлияна от намесата на еруфозина в специфичните сигнални пътища, свързани с *ras* и *raf* онкогените (които често са мутирали в туморните клетки) водещи до апоптоза. От друга страна, влиянието на еруфозина върху актиновата реорганизация ще повлияе туморната миграция и свързаните с нея протеини на Rho фамилията на малките GTP-ази.

При прилагането едновременно на електрично поле и еруфозин се запазва клетъчноспецифичното и концентрационно зависимо действие на еруфозина, като се наблюдава засилен цитотоксичен ефект – синергичен ефект на приложеното електрично поле. И при комбинираното действие на електрично поле с еруфозин най-чувствителна е високометастатичната клетъчна линия MDA-MB-231. Приложеното електрично поле (500 V/cm и 1000 V/cm) заедно с ниски дози еруфозин (15 μ M) води до драстично намаляване на клетъчната преживяемост на 50% (IC₅₀). Констатирахме, че това е и основната причина за намаляване на клетъчната миграция на MDA-MB-231 с 50 % при горните условия, която се демонстрира за първи път. Комбинираното действие на еруфозин и електрично поле предизвиква деполимеризиране на актиновите филаменти и дифузното им разположение в клетката при MDA-MB-231 за разлика от добре оформените актинови стрес фибри при самостоятелното действие на еруфозин и електрично поле. Налага се извода за различен цитотоксичен механизъм на действие на еруфозина в комбинация с електрично поле. Това се потвърждава и от проведените изследвания върху клетъчния цикъл и запускане на апоптоза при двете ракови

линии (MDA-MB-231 и MCF-7). При изследване на апоптотичната фаза при клетките, третирани самостоятелно с електрично поле и в комбинация с еруфозин, тя се оказва значително по-висока при клетки третирани едновременно с еруфозин и електрично поле. При MDA-MB-231 за първи път се демонстрират факти, свидетелстващи за наличие на клетъчен арест и предизвикване на митотична катастрофа при третирането им в комбинация еруфозин и електрично поле. Тези пилотни резултати са много обнадеждаващи и дават основание за бъдещи изследвания свързани с изясняване на точния механизъм на комбинираното действие на еруфозин и електрично поле.

Проведените изследвания в настоящата дисертация показват, че еруфозинът може да се приложи като ефективен и селективен антитуморен агент с незначителен ефект върху нормалната неракова тъкан заобикаляща тумора. Прилагането му в комбинация с високоволтови електрични импулси може да предостави една нова и ефективна терапия за третиране на метастатичния рак на гърдата с незначителни ефекти върху нормалната тъкан.

Изводи

1. Доказано е, че клетъчната адхезия и преживяемост на фибробласти и MCF-7 не се повлиява значително от електропорацията. Електротретирането на инвазивната клетъчна линия от рак на гърдата MDA-MB-231 индуцира увеличаване на клетъчната адхезия при по-ниски интензитети на полето и намаляване при 1000 V/cm. Клетъчната пролиферация и при двете туморни линии е нарушена от електропермеабилзацията.

2. Доказано е, че влиянието на електропорацията върху актиновия цитоскелет на фибробласти и туморни клетки е клетъчно специфично. В 3T3 клетките актиновият цитоскелет е временно разрушен, докато в раковите клетки, третирани с ниски и средни интензитети, актиновият цитоскелет образува добре оформени стрес фибри, ламелоподи и филоподи.

3. Типът клетъчна адхезия (клетка-субстрат или клетка-клетка), индуциран от електропорацията, е също клетъчно

специфичен. Докато при MDA-MB-231 доминира клетка-субстрат адхезията, при MCF-7 по-често се открива клетка-клетка адхезията.

4. Показано е, че най-чувствителна към действието на еруфозина е високометастатичната клетъчна линия MDA-MB-231 (естроген негативна), докато нетуморогенната клетъчна линия MCF-10A не се повлиява. Концентрация на еруфозина от 15 μ M причинява клетъчна смърт и провокира адхерентен клетъчен фенотип при високометастатичната клетъчна линия MDA-MB-231.

5. Тубулиновата мрежа не се повлиява от действието на еруфозина, като може да се предположи, че микротубулите не участват в трафика на еруфозина в клетката.

6. Прилагането на електрични импулси има синергичен ефект върху противотуморното действие на еруфозина.

Приноси към медицинската практика

1. Приложените електрични полета водят до промяна на клетъчния фенотип – намалена подвижност, водеща до намалена инвазивност.
2. При използването на електро(химио)терапията се съчетават два ефекта на електричното поле: намаляване дозите на прилаганите цитостатици чрез повишаване на тяхната локална концентрация (създаване на пори в мембраната) и втори адхезивен ефект, водещ до промяна на актиновия цитоскелет, намалена подвижност и инвазивност на трансформираните клетки. По такъв начин електропорацията придобива един нов анти-туморен ефект, който може да бъде наречен “адхезивен ефект”.
3. Изследването на адхезивното и миграционно поведение на епителни и фибробластни клетки при електротретиране е от значение за експерименталните протоколи на електро(химио)терапия, тъй като туморното обкръжение от фибробласти има ключово значение при третирането на тумори.
4. Изясняване цитотоксичния ефект на новия антитуморен агент еруфозин (самостоятелно и в комбинация с

електрично поле) и неговото действие върху актиновия цитоскелет на туморни клетки от рак на гърдата биха били от полза за оптимизиране на терапевтичните схеми при лечение на ранни фази на рак на гърдата.

Публикации във връзка с дисертационния труд

1. **Viktoria N Pehlivanova**, Iana H Tsoneva and Rumiana D Tzoneva, „**Multiple effects of electroporation on the adhesive behavior of breast cancer cells and fibroblsts**”, *Cancer Cell Int.* 2012, 12:9, doi:10.1186/1475-2867, IF-1.970.
2. **Viktoria Pehlivanova**, Iana Tsoneva, Rumiana Tzoneva, „**Influence of electroporation on cell adhesion, growth and viability of cancer cells and fibroblasts**”, *Comptes rendus de l'Acad'emie bulgare des Sciences* Volume 64, Issue No4, 2011, IF-0.212.
3. **Pehlivanova V. N.**, Uzunova V., Tsoneva I., Berger M. R., Ugrinova I., Tzoneva R., „**The effect of erufosine on cytoskeleton reorganization and cell death in malignant and non-tumorigenic adherent breast epithelial cell lines**”, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, ISSN 1310-2818, (in press), IF-0.760.
4. **Виктория Пехливанова**, Веселина Узунова, Яна Цонева, Мартин Бергер, Ива Угринова и Румяна

Цонева, „Изследване влиянието на Еруфозина върху адхерентни туморни и соматични клетки . Влияние на електропорацията върху клетъчната цитотоксичност.”, Science & Technologies, Volume II, Number 1, 2012, Medicine, 220-224.

Участия в научни конференции и семинари

1. **V. Pehlivanova, V. Krasteva, R. Tzoneva, I. Tsoneva**, постер на семинар с международно участие: „Експериментални модели и методи в биомедицинските изследвания” 16-17 Март, 2010, организиран от Института по експериментална патология и паразитология – БАН.
2. **Пехливанова В.** „Вторични ефекти на електропорацията върху адхезивното поведение на фибробласти и клетки от рак на гърдата”, Семинар на сесия за докторанти по проект към Оперативна Програма ”Развитие на човешките ресурси, 28.04.2010.
3. **V. Pehlivanova, V. Krasteva, I. Tsoneva, R. Tzoneva**, „**Multiple effect of electroporation on adhesive behavior of fibroblasts and breast cancer cells**”, 52nd Annual Meeting of the Italian Cancer Society, Rome, October 4 - 7, 2010, Poster.
4. **Виктория Пехливанова, Веселина Узунова, Яна Цонева, Мартин Бергер, Ива Угринова и Румяна Цонева**, „**Изследване влиянието на Еруфозина върху адхерентни туморни и соматични клетки. Влияние на**

електропорацията върху клетъчната цитотоксичност”,
Двадесет и втора международна конференция, Стара
Загора, 7 - 8 юни 2012, доклад.

5. International course Electroporation for Medicine: Basic Knowledge, Applications and Technologies, Bucharest, October 25-27, 2012.

6. **Виктория Пехливанова, Веселина Узунова, Яна Цонева, Румяна Цонева,**

„Влияние на електропорацията върху адхезията на фибробласти и клетки от рак на гърдата”, доклад на семинар с международно участие: „Биологична активност на метали, синтетични съединения и природни продукти”, организиран от Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей БАН, София, България, Ноември 27-29, 2012.