

Автореферат

на дисертация
за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР”
в област на висше образование: 4. „Природни науки, математика и информатика”
Професионално направление: шифър 4.3 „Биологични науки”
Научна специалност: „Биофизика”

на тема:

***Влияние на анти-туморни агенти върху
клетъчния мембранен интегритет и цитоскелет***

от:

инж. Веселина Пламенова Узунова

Научни ръководители: проф. д-р Румяна Цонева-Велинова
проф. д-р Албена Момчилова-Панкова, дбн

Гр. София, 2018 г.

Дисертационният труд съдържа 214 страници, 13 таблици и 89 фигури. Номерата на фигурите и таблиците в автореферата могат да не съответстват на тези в дисертацията.

Цитирани са 310 източника, от които 5 на кирилица и 305 на латиница. Във връзка с дисертационния труд са направени 6 публикации, от които 3 в чужди и 3 в български научни списания. Три от публикациите са с IF и 2 с ISSN.

Изследванията в дисертационния труд са финансирани по проекти DNTS/Germany 01/003; DNTS/Germany/004; ДФНИ-БО 02/5, ДФНИ-БО 02/23 и ДН 11/1 от 2017г, в които докторантът е участник. Ръководител е на един проект № ДФНП-128/12.05.2016 в рамките на „Програма за подпомагане на младите учени в БАН”. Спечеленият грант е на тема: ***„Анти-туморен ефект на хемоцианинови комплекси върху клетъчния сфинголипиден сигнален път и пролиферативната активност на ракови клетки”***.

Дисертационният труд е обсъден на разширен научен семинар на секция „Липид-белтъчни взаимодействия”, ИБФБМИ-БАН на 24.04.2018г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на от часа в залата на Институт по физиология на растенията и генетика – БАН, София 1113, ул. „Акад. Георги Бончев”, бл. 21, ет. 2.

Материалите свързани със защитата са на разположение в канцеларията на ИБФБМИ-БАН, София 1113, ул. „Акад. Георги Бончев”, бл. 105, ет. 1.

БЛАГОДАРНОСТИ

На първо място на научния си ръководител проф. д-р Румяна Цонева-Велинова, благодаря за поставената интересна тема на дисертационната работа, за помощта и професионализмът при изготвяне на практическата част към дисертацията, както и за полезните съвети, които получих по време на обучението ми в института. Без нейната помощ дисертацията нямаше да бъде завършена.

На втория ми научен ръководител проф. д-р Албена Момчилова-Панкова дбн, благодаря за знанията, които получих в областта на биологичните мембрани и свързаните с тях сигнални пътища.

Издавам благодарности на проф. д-р Ренета Тошкова от Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей - БАН, за възможността да взема участие в *in vivo* изследванията включени в дисертацията, както и за получените знания в областта на туморната имунология.

На проф. д-р Петър Петров от Институт по полимери - БАН, благодаря за предоставените биоматериали, без наличието на които част от *in vitro* и *in vivo* експериментите не биха могли да бъдат осъществени.

Благодаря на доц. Мая Гунчева от Институт по органична химия с център по фитохимия - БАН, която предостави новите хемоцианинови комплекси за анализ. Без нейната подкрепа и професионализъм голяма част от експериментите в дисертацията нямаше да бъдат реализирани, а също така и резултатите по младежкия проект основан на изследване на потенциала на хемоцианиновите комплекси като анти-ракови препарати.

Издавам благодарности на проф. Мартин Бергер от Немски институт за ракови изследвания, Хайделберг, Германия за предоставения нов анти-туморен агент еруфозин.

Дълбоко признателна съм на различните проекти,финансирани изследванията включени в дисертацията и националното и международното им представяне на научни конференции и семинари – DNTS/Germany 01/003; DNTS/Germany/004; ДФНИ-БО 02/5, ДФНИ-БО 02/23, ДФНП-128/12.05.2016 и ДН 11/1 от 2017г.

Благодаря на всички бивши и настоящи колеги от Институт по биофизика и биомедицинско инженерство, както и на колегите от Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев”, за помощта и дискусиите във връзка с моята работа.

На най-близките си колеги Соня Апостолова, Ирина Георгиева, Тихомира Стоянова и Иван Стойков, благодаря за безкрайната подкрепа и устремът за изследвания, с които ме

зареждаха, независимо от географското разстояние помежду ни, както и за реализацията на сплотения и изпълнен с идеи колектив.

И накрая, но не на последно място, благодаря с цялото си сърце на моето семейство и на човека до мен Атанас Михайлов, за тяхната постоянна подкрепа, любов и огромно разбиране през годините. Без вас тази изследователска работа нямаше да бъде започната, да не говорим за довършена. Благодаря ви много!

...и бих искала да пожелаая късмет на всички докторанти, които ще дойдат след мен и ще продължат да надграждат този дисертационен труд.

І.ВЪВЕДЕНИЕ

Ракът на гърдата е едно от най-често срещаните ракови заболявания сред жените в световен мащаб, което заема второ място по смъртност след сърдечно съдовите заболявания [Oakman C. et al., 2010].

В представената дисертация ще бъдат направени първи опити за комбинация на еруфозин (Erufosine, EPC3) и цитостатика доксорубицин (DOX) в *in vitro* и *in vivo* условия, както и с агенти с природен произход (хемоцианини), като стъпка към търсене на нови методи и придружаващи терапии за справяне с рака на гърдата.

Еруфозинът принадлежи към групата на алкилфосфохолините (APCs, анти-туморни липиди), а хемоцианините са кислород-пренасящи белтъци от хемолимфата на мекотели и артроподи. Някои видове хемоцианини днес са широко използвани в клиничната практика и имат потенциал като анти-туморно средство поради имуностимулаторните си характеристики и липсата на странични ефекти. За разлика от класическите химиотерапевтици, които атакуват директно ДНК, анти-туморните липиди се локализируют в клетъчните мембрани, като нарушават метаболизма на мембранните липиди и свързаните с тях трансмембранный сигнални пътища. Механизмът на действие на APCs и в частност на EPC3 все още не е изяснен напълно. Известно е, че APCs могат да предизвикат апоптоза в туморни клетки, не причиняват потискане на костния мозък и са особено подходящи за комбинирани терапии. Еруфозинът е първият представител, който може да се приложи интравенозно, което улеснява въвеждането му в *in vivo* условия. Много от алкилфосфохолините днес вече се прилагат и при лечение на пациенти [Kostadinova et al., 2015]. Някои от тях са изследвани като подходящи модулатори при редица вътреклетъчни и извънклетъчни сигнални молекули. Например, сфинголипидните метаболити играят важна роля в определяне съдбата на клетките. Сфингозин-1-фосфатът (S1P) упражнява функциите си както вътреклетъчно, така и извън клетките, като контролира пролиферацията, подвижността и инвазивността на раковите клетки. Въпреки, че вътреклетъчните функции не са добре изучени се смята, че S1P индуцира апоптоза [van Brocklyn J.R. et al., 2003]. Тъй като са необходими допълнителни изследвания за определяне на механизма, чрез който S1P индуцира процеса на апоптоза, ще се фокусираме върху

експресията му при клетки от рак на гърдата, инкубирани с EPC3, самостоятелно или в комбинация с хемоцианини или хемоцианинови комплекси с йонни течности.

Създаването на нови биоматериали с приложение в анти-туморната терапия, създава възможност за едновременна терапия и диагностика или т.нар. тераностика. Това позволява разработването на нови материали, повлияващи тъканната регенерация или инхибиране на туморната прогресия. Важно е да могат да бъдат поставени локално в мястото на тъканното увреждане или в областта на тумора. За да бъдат приложени *in vivo* биополимерите трябва да бъдат биосъвместими и да могат да се резорбират в организма. За тази цел механичната стабилност на биополимерите трябва да може да бъде регулирана, чрез добавяне на различни компоненти към тях или вариране в съотношенията на отделните компоненти, което да създаде нова структура. Кандидати за *in vivo* приложение са както електропроводимите полианилин/2-хидроксиетил целулозните (PANI/HEC), така и биосъвместимите и биоразградими поликапролактон/полиетилен оксидните (PCL/PEO) криогелове. PANI/HEC материалите са биосъвместими и притежават способността да отговарят на физиологично електрично поле (EP), за което е известно, че може да стимулира белтъчния синтез и продукцията на растежни фактори, активира матриксните металлопротеинази както при нормални така и при ракови клетки като по този начин индуцира тяхната пролиферация, адхезия и миграция [Tzoneva R. et al., 2014]. Тези процеси са важни за тъканното възстановяване и ангиогенеза. Поради всички тези възможности за контролиране на клетъчното поведение електропроводимите PANI/HEC полимери са подходящи за използване в нашите изследвания.

Важни параметри за приложението на биополимерите като лекарствени носители или за целите на регенеративната медицина са функционалност, която зависи от правилният подбор на съставните полимери и хидрофилно-хидрофобния баланс, който да осигури контролирано освобождаване на лекарствената субстанция. В дисертацията са избрани хидрофилният, биоразградим полиетилен оксид и хидрофобният поли(ϵ -капролактон) за да се демонстрира потенциалът им като система за удължено, контролирано доставяне на молекулите на доксорубицин и еруфозин с времето, а също така и на *in vivo* контрол върху разпределението им в тествания организъм с цел оптимален терапевтичен ефект.

Изследванията ще предоставят ценна информация в процеса на изучаване на възможностите за повлияване на клетъчни процеси като туморна инвазия и миграция, чрез което да се индуцира намаляване на метастатичния потенциал при туморните клетки. Проучванията върху различни биосъвместими полимери могат да се използват в съвременната тераностиката, както за контролирано освобождаване на анти-туморни агенти, така и за създаване на носители с подходяща структура за клетъчна колонизация и генериране на нова тъкан, след проведена туморна резекция.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертация е да се изследва механизмът на действие на синтетични и природни анти-туморни агенти върху метастатичния потенциал на клетки от рак на гърдата и в in vivo модел в хамстер.

За изпълнение на поставената в дисертацията цел бяха формулирани следните основни задачи:

Задача 1: *In vitro* изследване на анти-туморна активност на еруфозин

Задача 2: Изследване на анти-туморна активност на природни продукти – хемоцианини и техните комплекси с йонни течности

Задача 3: Охарактеризиране на биополимери за целите на регенеративната медицина и анти-туморната терапия

Задача 4: *In vivo* изследване на анти-туморната активност на еруфозин

III. МАТЕРИАЛИ и МЕТОДИ

Материали

Изследванията в дисертацията бяха проведени с няколко клетъчни линии с различен произход: човешка, нетуморогенна от епител на млечна жлеза (MCF-10A), две клетъчни линии от рак на гърдата – MCF-7 (неинвазивна) и MDA-MB-231 (инвазивна), Graffi миелоидни, тумор-индуциращи клетки и миши фибробласти от подкожна съединителна тъкан (L929) и ембрионални (3T3). Всички клетъчни линии бяха закупени от ATCC, а Graffi клетките бяха любезно предоставени от банката за клетъчни култури и вируси на ИЕМПАМ-БАН.

Върху тях бяха приложени агенти от синтетичен и природен произход с потенциално анти-туморно действие. От тях имаше един представител на последно поколение алкилфосфохолини - еруфозин (EPC3, синтезиран е от проф. Х. Ейбъл, Институт Макс Планк, Гьотинген, и любезно предоставен от проф. М. Бергер от Немски институт за ракови изследвания, Хайделберг, Германия) и един представител на конвенционалните цитостатици – доксорубицин (DOX). Изследвани бяха хемоцианини и техните комплекси с йонни течности (Ch.AAs), любезно предоставени от доц. М. Гунчева (Институт по органична химия с център по фитохимия, БАН).

Всички *in vivo* изследвания с хамстери (порода Златист Сирийски хамстер) бяха проведени под ръководството на проф. Р. Тошкова от ИЕМПАМ-БАН, и в съответствие с разпоредбите на Комисията по грижа за лабораторните животни, Комисията за науките за живота и Националния съвет за научни изследвания [Toshkova R. et al., 2010]. Хамстерите бяха закупени от Център по онкология, София.

Методи

За изпълнение на поставените цел и задачи в дисертацията бяха използвани голям набор от спектрофотометрични методи, флуоресцентни и имунофлуоресцентни микроскопии, поточно-цитометрични анализи и *in vivo* изследвания:

- ❖ МТТ-тест
- ❖ Фазово-контрастна микроскопия
- ❖ Витално оцветяване с АО/EtBr

- ❖ Флуоресцентно оцветяване - актин/DAPI
- ❖ Флуоресцентно оцветяване – актин/тубулин
- ❖ Флуоресцентно оцветяване за апоптоза/некроза
- ❖ Имунофлуоресценция – Rho A/Vimentin
- ❖ Метод на “зарастване на рана (ScratchAssay)”
- ❖ Флоуцитометричен анализ за определяне на апоптоза и некроза
- ❖ FACS анализ на клетъчен цикъл - Метод на Николети
- ❖ Опити *in vivo* при хамстери с тумор на Графи

Пълен списък на използваните материали и методи може подробно да бъде намерен в дисертацията – Глава 3. Материали и методи.

*Основните изследвания в дисертацията бяха проведени в лабораторията по клетъчно култивиране към секция Липид-белтъчни взаимодействия (ИБФБМИ-БАН, София). *In vivo* експериментите в хамстери бяха проведени в лабораториите на ИЕМПАМ-БАН, София.*

IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Получените резултати бяха разделени на четири части в зависимост от поставените за изпълнение задачи:

Част I. In vitro изследване на анти-туморна активност на еруфозин

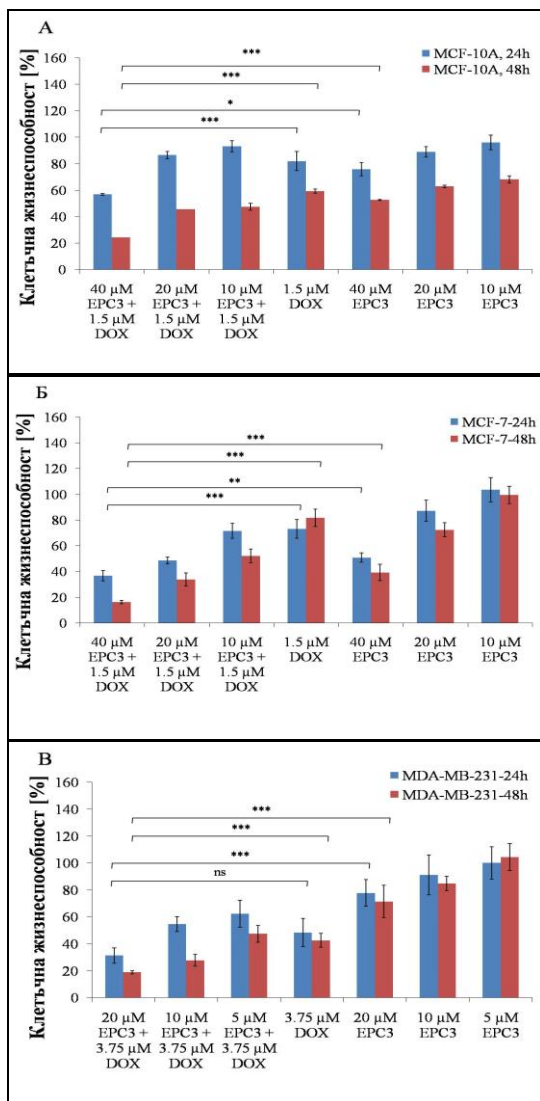
1. Изследване на клетъчна преживяемост след третиране с еруфозин и доксорубицин

За първи път повреме на изработване на експериментите по дисертацията беше използвано комбинирано третиране с еруфозин и конвенционалния цитостатик доксорубицин. Като моделно анти-туморно лекарство, доксорубицинът беше избран в настоящото изследване, тъй като притежава широка антитуморна активност при лечение на тумори на гърдата, шийката на матката, черния дроб и дебелото черво, както и при левкемия. Прилаганите терапевтични концентрации често водят до тежки странични ефекти, като например цитотоксичност към нормалната тъкан и мултирезистентност, които допълнително ограничават неговата терапевтична ефикасност [Pralathan C. et al., 2006; Crown J. et al., 2002; Freedman R.S. et al., 1980]. Целта на използването на еруфозина като придружаващ анти-туморен агент е да се усили или поне запази анти-туморното действие на доксорубицина, но при по-ниска негова доза, като се предполага, че така страничните ефекти от неговото прилагане ще бъдат значително намалени. От друга страна прилагайки двата анти-туморни агента се увеличава ефективността на терапията - туморната клетка се атакува по два различни механизма: чрез инхибиране на ДНК синтеза (доксорубицин) и предизвикване на апоптоза чрез мембранно действащия еруфозин.

Оценката от ефекта на тази комбинация върху клетъчната пролиферация, преживяемост и жизнеспособност на клетки от рак на гърдата: MCF-7 и MDA-MB-231 и нетуморогенни клетки MCF-10A, е извършена чрез стандартен МТТ тест, основан на преобразуване на тетразолиевата сол от оксидоредуктазни ензими до неразтворим формазан (цветно съединение) и измерване на абсорбционния интензитет на оцветяване на разтвора след разтваряне на получените кристали. Еруфозинът е използван в концентрации $\frac{1}{2}IC_{50}$, $\frac{1}{2}IC_{75}$ и $\frac{1}{2}IC_{25}$ за различните клетъчни линии, а доксорубицинът е $\frac{1}{2}$ от IC_{50} дозата (за MCF-10A и MCF-7 приложената концентрация е 1.5 μM , а за MDA-MB-231 е 3.75 μM) за време на действие – 24 и 48 часа. IC_{50}

дозите на EPC3 са изчислени при по-ранни наши изследвания, докато използваните концентрации на DOX са избрани спрямо литературни данни [Tassone P. et al., 2003].

Получените резултати са представени на фигура 4.I.1. Нераковата, епителна клетъчна линия MCF-10A остава като цяло нечувствителна на действието на EPC3 в комбинация с DOX ($\frac{1}{2}IC_{50}$, $\frac{1}{2}IC_{75}$ или $\frac{1}{2}IC_{25}$ $\frac{1}{2}DOX$). Единствено комбинация 40 μM EPC3/1.5 μM DOX води до клетъчна преживяемост около 60% на 24-я час от инкубацията (фиг.4.I.1.A). От получените от нас по-рано резултати [Pehlivanova V. et al., 2013^a], еруфозинът показва избирателна токсичност към клетъчни линии от рак на гърдата в концентрации, които не са токсични за нетуморогенната MCF-10A линия. Най-чувствителна към действието на еруфозин е високо инвазивната клетъчна линия MDA-MB-231. Пролиферативната активност на MDA-MB-231 намалява до 80% на 48-я час след третиране с $\frac{1}{2} IC_{50}$ еруфозин, докато жизнеспособността при MCF-10A и MCF-7 клетки, остава много висока (100%) при същата концентрация (фиг.4.I.1.B). За разлика от високата чувствителност към еруфозина, MDA-MB-231 проявява по-слаб отговор към действието на DOX (по литературни данни), което се вижда от количеството на прилаганата ефективна доза 3.75 μM ($\frac{1}{2} IC_{50}$), спрямо хормон-зависимата MCF-7 линия и нераковата MCF-10A ($\frac{1}{2}IC_{50}$ - 1.5 μM DOX) [Tassone P. et al., 2003]. В настоящето изследване двете ракови линии са третирани в комбинация от еруфозин и диксорубицин. При MCF-7 се наблюдава забавяне и концентрационно намаляване на пролиферативната активност на клетките след 24 час при комбинирано третиране с $\frac{1}{2} IC_{50}$ и $\frac{1}{2} IC_{75}$ еруфозин и $\frac{1}{2} IC_{50}$ DOX в сравнение със същите концентрации на чистите агенти (фиг.4.I.1.B). Комбинацията $\frac{1}{2} IC_{75}$ EPC3 и $\frac{1}{2} IC_{50}$ DOX показва адитивен токсичен ефект, чието действие намалява преживяемостта на клетъчната линия под IC_{50} стойностите и на двата агента. Тази тенденция се запазва и на 48-я час. При MDA-MB-231, комбинация от по-ниска концентрация на еруфозин ($\frac{1}{2}IC_{50}$ за еруфозина за MDA-MB-231 е 20 μM , докато за MCF-7 това е 40 μM) с доксорубицин (20 μM EPC3/3.75 μM DOX) показва синергичен токсичен ефект, чието действие намалява преживяемостта на клетъчната линия под IC_{50} стойностите на отделните вещества (фиг.4.I.1.B).



Фиг.4.1.1. Клетъчна жизнеспособност на А) MCF-10A, Б) MCF-7 и В) MDA-MB-231 клетки, третирани с три концентрации на еруфозин, IC_{50} дозата на DOX за съответната линия и комбинации от EPC3 и DOX. Време на инкубация 24 и 48 часа. Статистиката е направена с ANOVA one-way тест и Tukey – Kramer post test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, ns- без статистическа разлика).

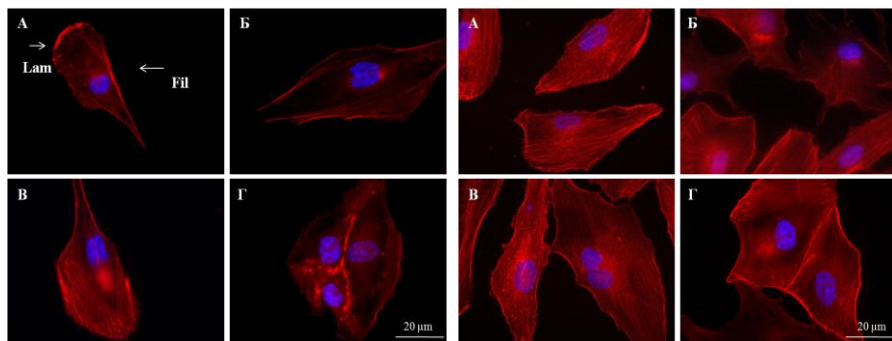
Обобщените резултати показват, че цитотоксичния ефект на еруфозина е клетъчно специфичен и се усилва с времето. Комбинирането на еруфозин с конвенционалния цитостатик доксорубин, в ниски дози при раковите линии води до увеличаване на цитотоксичния ефект проявен от отделното прилагане на двата агента и е с потенциал за разработване на нови терапевтични схеми за успешното лечение на рака и преодоляване лекарствената резистентност и страничните ефекти от използването самостоятелно на конвенционалния химиотерапевтик доксорубин.

2. Комбинирано влияние на еруфозин и доксорубин върху цитоскелетната организация на MCF-10A, MCF-7 и MDA-MB-231 клетъчни линии

За да се оцени влиянието на еруфозин, доксорубин и комбинация от двата агента, върху организацията на актиновия цитоскелет, тестваните MCF-10A клетки бяха оцветени за актин с фалоидин-TRITC (Sigma-Aldrich, Германия). Нетретираните клетки показаха нормална морфология – на фигура 4.1.2.A може да се види филоподий-базирана клетъчна миграция, характерна за 2 D-субстрати. При много от клетките се осъществява чрез формиране на мехурче и/или с разширяване на водещия край на плазмената мембрана [Condeelis J., Segall J.E., 2003]. С повишаване на концентрацията на EPC3, клетъчните структури обуславящи миграцията при клетките изчезват. Наблюдават се клетки с издължена форма, характерна за фибробластите, и обуславяща по-висока клетъчна адхерентност. При третиране на клетките с 40 μ M EPC3 се наблюдава частично разрушаване на „клетка-клетка” контактите – (фиг.4.1.2.Г). Известно е, че адхезията между клетките е основа за формирането на високо организирани мултицелуларни структури, [Vasioukhin V. et al., 2001] а в случая тяхното разрушаване, би довело до по-висока пропускливост на монослоя. На 48-я час от експеримента, високите концентрации на EPC3 водят до изтъняване на актиновите филаменти (фиг.4.1.3.Г) спрямо нетретираните клетки и клетки инкубирани с 10 и 20 μ M EPC3 (фиг.4.1.3.A, Б и В). Въпреки това, клетките запазват адхерентната си форма при всички приложени EPC3 концентрации.

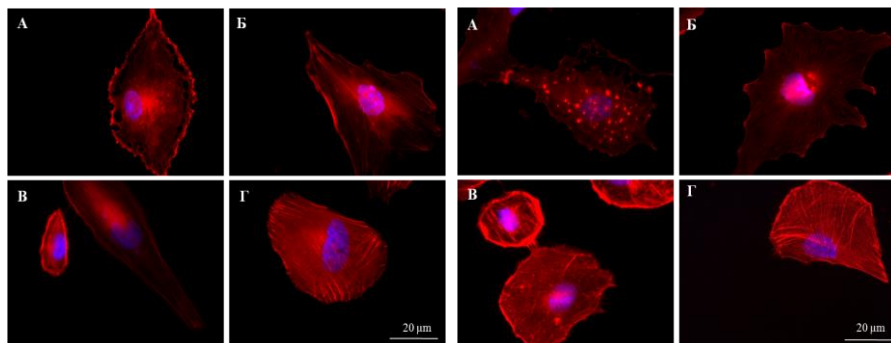
Фигури 4.1.4. и 4.1.5. показват резултатите от комбинираното третиране с еруфозин и доксорубин на MCF-10A клетки. Третиране с 40 μ M EPC3 и $\frac{1}{2}$ IC₅₀ на DOX (1.5 μ M) води до разкъсване на цитоскелета в краищата на клетките (24 час, фиг.4.1.4.A), а

на 48-я час ефектът е по-силен, като това третиране води до пълна актинова деполимеризация на стрес нишките и клетъчна деструкция (фиг.4.1.5.А). С намаляване на прилаганата комбинирана доза се наблюдава връщане към нормалната клетъчна морфология – проява на филоподии, ламелоподии и стрес нишки (фиг.4.1.4. и 4.1.5. Б и В). Излагане на MCF-10A клетките на действието на 1.5 μM DOX не оказва видими промени върху нормалната актинова организация (фиг.4.1.4 и 4.1.5. Г). В предишни изследвания беше показано действието на еруфозин върху клетки от рак на гърдата. Клетъчният отговор на тройнонегативната ракова линия MDA-MB-231 към действието на еруфозин е по-добре изявен от хормон-зависимата MCF-7 клетъчна линия [Pehlivanova V. et al.2013^a].



Фиг.4.1.2. Оцветяване за актин с фалоидин-TRITC (червено) на MCF-10A клетки след 24 часа третиране с еруфозин. А) нетретираны клетки; EPC3-третираны: Б) 10 μM ; В) 20 μM ; Г) 40 μM . Клетъчните ядра са оцветени с DAPI (синьо), Fil – филоподиум, Lam – ламелоподиум. Бар - 20 μm .

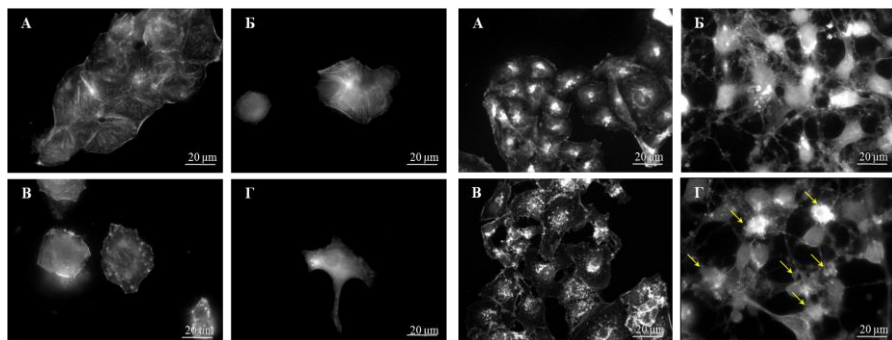
Фиг.4.1.3. Двойно оцветяване на MCF-10A клетки след третиране с еруфозин, инкубирани 48 часа. А) нетретираны клетки; EPC3-третираны: Б) 10 μM ; В) 20 μM ; Г) 40 μM . За цитоскелетен актин е използвана боята фалоидин-TRITC, а клетъчните ядра са оцветени с DAPI (синьо). Бар - 20 μm .



Фиг.4.1.4. Двойно оцветяване на MCF-10A клетки след третиране с еруфозин-доксорубицин, инкубирани 24 часа. А) клетки третирани с 40 μM EPC3+ 1.5 μM DOX; Б) 20 μM EPC3 + 1.5 μM DOX; В) 10 μM EPC3 + 1.5 μM DOX; Г) 1.5 μM DOX. Бар - 20 μm .

Фиг.4.1.5. Оцветяване за актин с Phalloidin-TRITC на MCF-10A клетки след третиране с еруфозин и доксорубицин и инкубирани за 48 часа. А) клетки третирани с 40 μM EPC3+ 1.5 μM DOX; Б) 20 μM EPC3 + 1.5 μM DOX; В) 10 μM EPC3 + 1.5 μM DOX; Г) 1.5 μM DOX. Бар - 20 μm

В пълен контраст с нераковата линия MCF-10A, линия MCF-7 реагира на приложеното комбинирано третиране още след 24 час. Фигура 4.1.6. Г показва свиване на клетката около ядрото, вследствие разрушаване на актиновия цитоскелет. Формираните клетъчни струпвания на фигура 4.1.6.А (контролни, нетретирани клетки) не се наблюдават при инкубиране на клетките с IC_{50} на EPC3 или при клетки подложени на комбинирано третиране. Един от факторите определящ жизнеспособността на клетките е способността им да формират нормална колония от клетки. Доксорубицинът индуцира цитоскелетно ремоделиране с формиране на кортикален контрактилен пръстен в клетъчната периферия и намаляване на централните нишки на напрежение, което води до нарушена клетъчна адхезия и отлепяне на клетките от ИКМ - 4.1.6.Б. Известно е, че стресовите нишки се асоциират с взаимодействието на актиновата мрежа с околната среда, като ИКМ, докато кортикалният актин - с кадхерин-базираната „клетка-клетка адхезия” [Chalut K.J., Paluch E.K., 2016; Engl W. et al., 2014].



Фиг.4.1.6. Оцветяване за актин с фалоидин-TRITC на MCF-7 клетки след третиране с еруфозин и доксорубицин, инкубирани 24 часа. На фигурата: А) нетретирани-контролни клетки; Б) клетки третиране с 1.5 μM DOX; В) клетки третиране с 40 μM EPC3; Г) клетки третиране с комбинация от 40 μM EPC3 и 1.5 DOX. Бар - 20 μm .

Фиг.4.1.7. Оцветяване за актин с фалоидин-TRITC на MDA-MB-231 клетки след третиране с еруфозин и доксорубицин, инкубирани 24 часа. На фигурата: А) нетретирани-контролни клетки; Б) клетки третиране с 3.75 μM DOX; В) клетки третиране с 20 μM EPC3; Г) клетки третиране с комбинация от 10 μM EPC3 и 3.75 μM DOX. Бар - 20 μm .

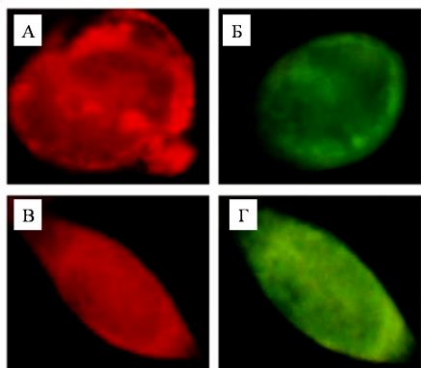
Цитоскелетно ремоделиране беше наблюдавано и при високометастатичната клетъчна линия от рак на гърдата след комбинирано третиране с еруфозин-доксорубицин. Комбинация от $\frac{1}{2}$ IC₅₀ на EPC3 (10 μM) и $\frac{1}{2}$ IC₅₀ на DOX (3.75 μM) води до разрушаване на актиновия цитоскелет, както и до загуба на клетки – ясно се разграничава рехавостта в монослоя. При 70%-та от клетките освен свиване на цитоскелета около ядрото се наблюдава формирането на малки мехури (фиг.4.1.7.Г, жълти стрелки). Деполимеризацията или разкъсването на актиновите филаменти (загуба на актинови стрес нишки), е ясен белег за подготовката на клетките да навлязат в процес на апоптоза [Bursch W. et al., 2000]. Тази клетъчна линия показва и по-висока чувствителност на действието на доксорубицин (фиг.4.1.7.Б) – деполимеризация и загуба на актинови структури.

В резултат на настъпващото разрушаване на цитоскелета и кондензацията на хроматина, фрагментиране на ДНК, както и мембранното формиране на мехурчета се достига до запускане на процеса на апоптоза.

3. Изследване на тубулиновата мрежа в *Graffi* миелоидни клетки

Динамичното регулиране на цитоскелетните микрофиламенти е от решаващо значение за клетъчната адхезия и миграция [Jiang H. *et al.* 2014]. В предишни наши изследвания демонстрирахме, че излагането на клетки от рак на гърдата (MCF-7 и MDA-MB-231), както и на нетуморогенните епителни клетки MCF-10A на действието на еруфозин не води до промени в микротубуларната организация [Pehlivanova V. *et al.*, 2013^a].

В настоящата дисертация за първи път е изследван ефектът на EPC3 върху цитоскелета (микрофиламенти и тубулинови филаменти) на *Graffi* клетки. Клетъчната линия е от миелоиден тип и се характеризира с амебовидно клетъчно придвижване, при което се наблюдава клетъчна деформация и слабо взаимодействие с ИКМ. Движението се генерира от кортикален актин и формирането на т.нар. мехурче (bleb) в клетъчната мембрана (фиг.4.1.8.А). Микроскопският анализ на контролните, нетретирани клетки демонстрира концентриране на актинови и тубулинови филаменти в кортикалната част на клетката, включително и в частта, в която се формира мехурчето на придвижване (фиг.4.1.8.А и Б). В контраст, след третиране с високи концентрации на алкилфосфохолина EPC3 (IC₇₅), флуоресцентните изображения показват дифузно актиново и тубулиново оцветяване (фиг.4.1.8. В и Г). Клетките придобиват удължена форма, което обуславя промяната в клетъчната морфология към адхерентна (фиг.4.1.8.В). Този факт потвърждава наши предишни изследвания, при които еруфозинът предизвиква адхезивен фенотип при MDA-MB-231 клетки [Pehlivanova V. *et al.* 2013^a], който процес би довел до намаляване на инвазивността на раковите клетки.



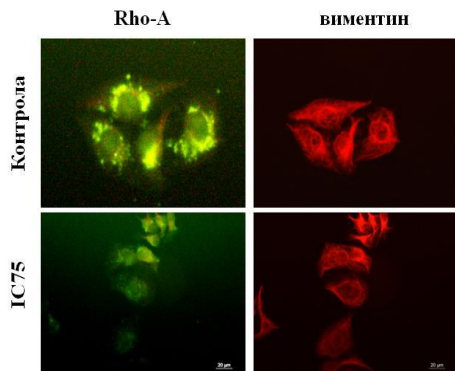
Фиг.4.1.8. Индуциране на актинова и тубулинова реорганизация на Graffi клетки под действието на 30 μM еруфозин. Клетките са оцветени за актин с фалоидин-TRITC (червено) и мише IgG1 моноклонално антитяло срещу тубулин (зелено). А и Б – контролни, нетретиранни клетки; В и Г – клетки третирани с еруфозин.

4. Изследване на цитоскелетните белтъци Rho-A и виментин

Rho семейството на малките GTP-ази действат като регулиращи молекулни посредници между нормалните клетъчни процеси (например клетъчна пролиферация) [Prendergast G.C., 2001], но също така е установено, че участват в патологични процеси отговорни за развитието на рак [Ridley A.J., 2004]. Rho-A и Rho-C са свръхекспресирани в широк спектър от тумори, особено тези с епителен произход [Orgaz J.L. et al., 2014]. Прекомерната експресия на Rho-A, при рак на гърдата показва лоша диагностична прогноза, поради увеличение на туморната клетъчна пролиферация и инвазия и тумор-зависима ангиогенеза [Pille J.Y. et al., 2005]. Последни изследвания показват, че високата експресия на белтъка виментин, участващ в изграждането на интермедиерните филаменти, е прогностичен маркер за висока туморна изява [Satelli A., Li S., 2011]. Известно е, че експресията на виментин се повишава в няколко агресивни клетъчни линии на рак на гърдата и тази експресия е свързана с повишената миграция и инвазията на раковите клетки [Korsching E. et al., 2005]. Използване на стратегията за блокиране на Rho-сигналния път и прекомерната експресия на виментин би довело до намаляване на агресивността на тумора.

Проведохме експерименти, при които MDA-MB-231 клетки бяха третирани с IC₇₅ на еруфозин за 24 часа и бяха оцветени с антитяло специфично свързващо Rho-A и виментина в клетките. Докато контролните, нетретиранни клетки показват висока експресия на Rho-A с локализация в перинуклеарното пространство, то при клетки третирани с IC₇₅ на еруфозин, експресията на Rho-A е доста намалена, както се вижда

от фиг.4.1.9. Заедно с това се наблюдава и изтъняване (намаляване на флуоресцентния интензитет) на интермедиерните филаменти изградени от белтъка виментин (фиг.4.1.9.). Колективно тези данни сочат за намаляване на инвазивния потенциал на MDA-MB-231 под въздействието на еруфозина. Блокирането на експресията на виментин би довело до намаляване на агресивността на тумора.



Фиг.4.1.9. Изследване на клетъчната локализация на Rho-A и клетъчната организация на виментин след третиране с еруфозин за 24 часа и оцветени за Rho-A (зелено) и виментин (червено). Бар - 20 μm .

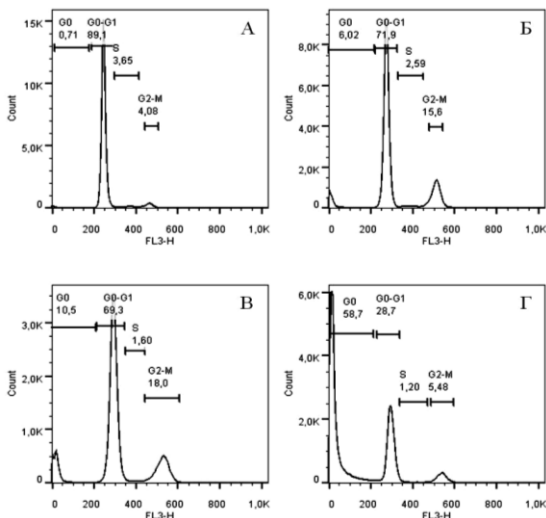
5. Индуциране на клетъчна смърт

Индукцирането на апоптоза е един от желаните ефекти в разработването на нови анти-туморни препарати [Hickman J.A., 1992]. По тази причина, за установяване на проапоптотичния потенциал на еруфозин, бяха проведени *in vitro* изследвания с MDA-MB-231, MCF-7 и *Graffi* миелоидни клетки. За контрола са използвани MCF-10A епителни клетки. Първите експерименти включваха използването на флуоресцентни маркери като DAPI, акридин оранж (АО) и етидиев бромид (EtBr). Получените резултати показаха различната чувствителност към еруфозин на използваните клетки, в зависимост от тяхната инвазивност и метастатичен потенциал. Високоинвазивната клетъчна линия MDA-MB-231 демонстрира най-силна чувствителност към действието на еруфозин, докато нераковата линия проявява висока степен на резистентност. Миелоидните *Graffi* клетки заемат междинно положение между MDA-MB-231 и MCF-7. При тях IC₅₀ и IC₇₅ концентрации на ЕРС3 водят до появата на апоптотични ядрени телца, белег за протичане на късна фаза на апоптоза.

Разтворът на акридин оранж (АО) и етидиев бромид (EtBr) беше използван за визуализиране на жизнеспособни, некротични и апоптотични клетки след третиране с еруфозин, като данните показаха, че EPC3 води както до ранно-апоптотични, така и до късно-апоптотични клетки (данните са подробно представени в дисертацията).

Вторият тип *in vitro* изследвания включваха използването на поточна цитометрия (FACS анализ) за количествено определяне на клетки навлезли в процес на апоптоза под влияние на еруфозин. Тази част от клетките е известна още като суб-G1 популация, и нарастването ѝ е характерен белег при протичане на апоптоза. Фигура 4.I.10 показва разпределение на клетъчния цикъл на контролната клетъчна линия MCF-10A. След третиране с EPC3 се наблюдава дозозависимо намаляване на пика G₀/G₁, като в нетретираните клетки около 90% от тях се намират в тази фаза от клетъчния цикъл и достигат до 28.7% при третиране с концентрация на EPC3 от 60 μ M (фиг.4.I.10.Г). Най-голямо увеличаване на G₂/M пика се регистрира при 40 μ M еруфозин (18%). Тази концентрация на анти-раковия агент предизвиква и повишаване на процента на суб-G1-фракцията - до 10.5% (фиг.4.I.10.В). Спрямо нетретираните клетки представлява 10кратно увеличение на популацията. Това е характерен белег за протичане на апоптоза и едновременно с това на задържане на голям брой клетки във фазата на делене. Еруфозинът също така оказва влияние и върху S-фазата от клетъчния цикъл. В нетретираната контрола около 3.65% от клетките се намират във фаза на ДНК синтез и репликация, докато третиране с EPC3 намалява този процент и в най-високо приложената концентрация той е само 1.2%.

Подобно на нетрансформираната клетъчна линия се наблюдава дозозависимо повишаване на броя на суб-G1 популацията от MCF-7 клетки (таблица 4.I.1), представляваща потенциално апоптотични клетки. Още на 24-я час от изследването, концентрация 40 μ M EPC3 увеличава 4 пъти (19.65%) суб-G1 пика в сравнение с този на нетретираните клетки (4.50%).



Фиг. 4.1.10. Изследване на клетъчен цикъл след третиране с еруфозин за 48 часа на клетъчна линия MCF-10A. А) контрола; Б) клетки третиран с 20 μM EPC3; В) третиран с 40 μM ; Г) третиран с 60 μM ; Означения: G0 – суб-G1-фракция; G0/G1 – клетки в G1-фазата на клетъчния цикъл; S – клетки в S-фазата на клетъчния цикъл; G2/M – клетки в G2/M-фазата на клетъчния цикъл. Към всяка хистограма е даден съответният процентен дял на клетките в отделните фази от клетъчния цикъл.

Еруфозин с концентрация 60 μM , води до най-висок процент на ракови клетки намиращи се в същата фаза, до 8 пъти (36.83%) спрямо нетретираните MCF-7 клетки, като процентът е още по-висок на 48-я час ($\approx 50\%$). И при тази клетъчна линия, EPC3 оказва влияние върху S-фазата на развитие. Популацията намалява около два пъти както на 24, така и на 48-я час. Клетките намиращи се във фаза G2/M плавно се увеличават и от 14_(24ч)/16%_(48 ч) в нетретираната група, достигат 19%_(24ч)/20%_(48ч) при третиране с 40 μM EPC3.

Таблица 4.1.1. Клетъчен цикъл на линия MCF-7 от рак на гърдата.

Фаза на клетъчен цикъл	Брой клетки [%]			
	Контрола	Концентрация на EPC3 [μM]		
		20	40	60
Суб-G1	4,50*/2,27**	8,59/4,39	19,65/6,61	36,83/49,88
G0/G1	59,4/56,5	56,3/52,46	50,68/47,13	36,89/28,11
S	16,63/12,87	17,83/18,51	7,85/7,28	7,33/7,91
G2/M	14,03/15,89	12,25/18,55	18,88/19,83	17,32/12,88
Полиплоидна фракция (>4N)	7,71/6,30	7,9/6,0	7,98/5,80	6,98/6,20

*- първата стойност от всички клетки с за 24-я час

** - втората стойност от всички клетки с за 48-я час

За разлика от MCF-7 клетките, голяма част от които се намират в суб-G1 фаза, при MDA-MB-231 клетките се наблюдава задържане на голяма част от тях във фаза G2/M. 3.53% от клетките инкубирани с IC₅₀ (20 µM EPC3) се намират в суб-G1 фаза а при 30 µM EPC3 - 6%_(24ч) и 17.68%_(48ч), съответно. Високата концентрация, както и продължителността на третиране довеждат до почти 9 пъти увеличение на апоптотичната фракция от клетки спрямо контролната група. Процентът на клетки във фаза G2/M плавно се увеличава с повишаване на концентрацията от еруфозин. От таблицата се вижда, че 20 и 30 µM EPC3 предизвикват задържане на над 30% от клетките в тази фаза още на 24-я час от третирането, където може да се говори за митотичен арест на клетъчния цикъл. EPC3 оказва влияние и върху S-фазата на клетъчно развитие. Популацията в тази фаза намалява около три пъти на 24-я час и два пъти на 48-я час. Повишава се и броя на полиплоидните клетки (> 4N), като ефектът е по-ясно изразен на 48-я час от третирането. В нетретираната група полиплоидната фракция е между 2 и 3%, докато EPC3 IC₅₀ повишава на 48-я час от третирането шест пъти (13.10%) процента на полиплоидни ракови клетки.

Таблица 4.1.2. Клетъчен цикъл на линия MDA-MB-231 от рак на гърдата.

Брой клетки [%]				
Фаза на клетъчен цикъл	Контрола	Концентрация на EPC3 [µM]		
		10	20	30
Суб-G1	1,69*/2,04**	2,25/2,10	3,53/3,43	6,01/17,68
G0/G1	55,17/59,18	57,22/63,67	53,4/48,70	46,08/35,85
S	18,04/16	13,18/15,06	5,82/9,8	5,28/7,16
G2/M	21,04/16,28	22,91/15,15	31,58/24,52	37,87/28,43
Полиплоидна фракция >4N	2,92/2,14	3,51/3,20	4,33/ 13,10	5,41/ 10,40

*- първата стойност от всички клетки е за 24-я час

** - втората стойност от всички клетки е за 48-я час

В предишни проучвания също е наблюдавано задържане в G2/M фазата след третиране с еруфозин на плоскоклетъчни карциномни и левкемични клетки [Кароог V. et al., 2012; Martelli A.M. et al., 2010]. Доказано е, че при левкемичните клетки, еруфозинът причинява спиране на клетъчния цикъл чрез регулиране на циклин D1 и циклин D1-зависимите протеин кинази [Кароог V. et al., 2012]. В наши изследвания [Ugrinova I. et al., непубликувани данни] изучихме ефекта на EPC3 върху експресията

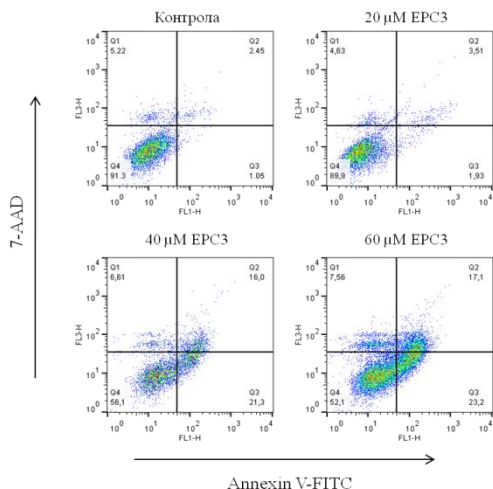
на циклини В и Е2 както и на две циклин зависими кинази (CDK1 и CDK2) в клетките от рак на гърдата (MCF-7 и MDA-MB-231). Циклин В и партньора му циклин зависимата протеин киназа CDK1 определят прехода на клетките от G2 в М-фаза, докато втората двойка Е2 и CDK2 определя този от G1 в S-фазата на клетъчния цикъл [Casimiro M.C. et al., 2012]. С повишаване на концентрацията на еруфозина се потиска експресията на CDK1 до 48-я час и при двете клетъчни линии, докато при CDK2 по-голям ефект се наблюдава на 24-я час при ниско инвазивната MCF-7 клетъчна линия. На 24-я час EPC3 оказва подобен ефект и върху експресията на циклини В и Е2 [Ugrinova I. et al., непубликувани данни]. Тези резултати съвпадат с представените FACS данни от клетъчния цикъл, като се вижда, че експресията им намалява с настъпващите изменения във фазите на цикъла. Намаленото количество на CDK1 и циклин В кореспондира с увеличения брой клетки в G2/М-фаза, наблюдавано при клетки MDA-MB-231. CDK2 и Е2 са отговорни за прехода G1/S, и намаляването им може да обясни намаления брой MCF-7 клетки в съответните фази (два пъти намаляват клетките на 24-я час в S-фазата).

Съществуват данни, че раковите клетки подлежат на полиплоидизация при третиране с ДНК-увреждащи агенти и такива, насочени към митотичния контролен пункт [Cortes F. et al., 2004]. Микроядрата са типичен отличителен белег на клетки, които са били подложени на митотична катастрофа, т.е. клетъчна смърт по време на продължителна М-фаза [Sliwinska M.A. et al., 2009]. Индукцията на полиплоиди може да се счита за благоприятен ефект от третирането. Например наличие на полиплоидни клетки в лекарствено третирани тумори на пациенти с колоректален карцином, корелират с положителен отговор на лечението [Bendardaf R. et al., 2004].

Пикът суб-G1 е формиран на базата на ДНК фрагменти, от където можем да направим извода, че съставлящите го клетки са с понижено ДНК съдържание (хиподиплоидни), т.е. че са апоптотични. Ако дадена клетка навлезе в апоптоза след като е преминала през S-фазата, е възможно на хистограмата да не попадне в суб-G1 поради по-голямото ѝ ДНК съдържание. Също клетките, които са загубили ДНК в резултат на друг тип клетъчна смърт ще бъдат включени в суб-G1 пика. За това проведохме следващият FACS анализ за определяне на апоптоза (ранна и/или късна) и некроза при клетки, третирани с EPC3, използвайки флуоресцентните маркери FITC-

конюгиран Анексин V (за апоптоза) и 7-амино-актиномицин D (7-AAD, за загуба на цялост на клетъчната мембрана).

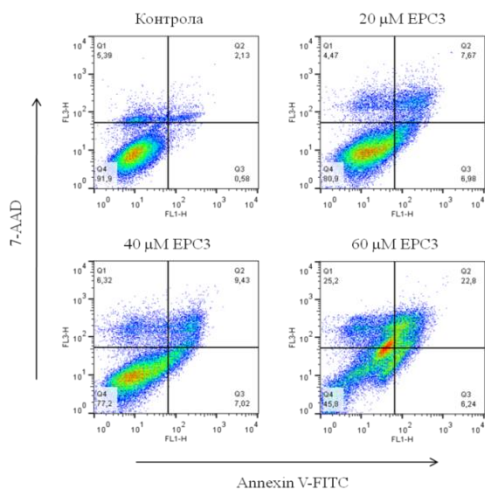
И за трите клетъчни линии - MCF-10A, MCF-7 и MDA-MB-231, по-голямата част от нетретираните клетки (контрола) са жизнеспособни и отрицателни за Анексин V и 7-AAD (MCF-10A, 91.3%, MCF-7, 91.9% и MDA-MB-231, 94.3%). Висок остава процентът на жизнеспособни MCF-10A клетки и при прилагане EPC3 в концентрация 20 μ M (90%). Процентното разпределение на ранно-апоптотични, късно-апоптотични и некротични клетки не се променя спрямо нетретираната контрола (фиг.4.I.11.). С нарастване на приложената концентрация до 40 и 60 μ M EPC3, процентът на отрицателни за Анексин V и 7-AAD клетки намалява на 56.1% и 52.1%, в същото време значително се увеличава броят на ранно-апоптотичните и късно-апоптотичните клетки. И при двете концентрации на анти-туморния агент се вижда, че преобладава броят на ранно-апоптотичните клетки – 21.3% и 23.2% (20-23 пъти повече спрямо нетретираните клетки). Броят на късно-апоптотичните клетки също нараства, на 16% и 17.1%, което представлява увеличение от 6.5 и 7 пъти (съответно за 40 и 60 μ M EPC3) спрямо контролната група. Само 6.61% при 40 μ M EPC3 и 7.56% при 60 μ M EPC3 от клетките на MCF-10A са двойно положителни (Анексин V⁺, 7-AAD⁺), показателни за протичане на некроза, което представлява увеличение на броя клетки от едва 1.26 и 1.4 пъти за съответната концентрация на еруфозина (фиг.4.I.11.).



Фиг.4.I.11. EPC3-индуцирана клетъчна смърт при MCF-10A клетки след 48 часова инкубация, анализирана чрез поточна цитометрия. За FACS анализа са използвани флуоресцентни маркери Анексин V-FITC и 7-AAD.

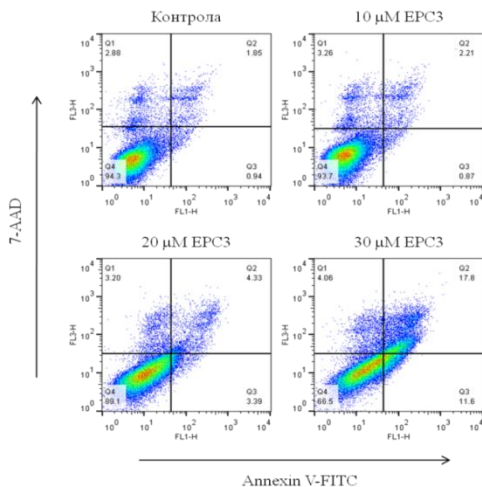
За разлика от контролната MCF-10A клетъчна линия, процентното разпределение на ранно-апоптотични, късно-апоптотични и некротични MCF-7 клетки се увеличава 2.2 пъти след 48 часовата инкубация с 20 μM EPC3. От фигура 4.1.12 се вижда, че анти-туморния агент приложен в концентрация 20 μM , увеличава предимно броят на ранно-апоптотичните клетки. Дванадесет пъти нараства процентът на клетки в ранна и 3.6 пъти на тези в късна фаза на апоптоза, спрямо нетретираните MCF-7 клетки. Процентът на некротични клетки остава приблизително еднакъв с този от нетретираната контрола.

С увеличаване на приложената EPC3 концентрация намалява процентът на отрицателни за Анексин V и 7-AAD клетки до 45.8% (60 μM EPC3) и се увеличава броят на ранно- и късно-апоптотичните и некротични клетки. При 40 μM EPC3, по-голяма част от клетките (9.43%) се намират във фаза на късна апоптоза и некроза (6.32%). Тенденцията се запазва и при 60 μM EPC3, но вече по-голям процент от клетките 22.8% и 25.2% се намират съответно във фаза на късна апоптоза и некроза. Високата концентрация от 60 μM EPC3 води до 3.72 пъти повече ранно-апоптотични клетки в нетрансформираната клетъчна линия спрямо раковата и 1.3 пъти повече късно-апоптотични ракови клетки спрямо тези на MCF-10A. Тази концентрация подтиква към некроза 3 пъти повече раковите клетки отколкото нетрансформираните.



Фиг.4.1.12. EPC3-индуцирана клетъчна смърт при MCF-7 клетки след 48 часова инкубация, анализирана чрез поточна цитометрия. За FACS анализа са използвани флуоресцентни маркери Анексин V-FITC и 7-AAD.

При същите експериментални условия, но по-ниски концентрации на еруфозин (от 10-30 μM EPC3), клетъчна линия MDA-MB-231, показва значително изменение в процентното разпределение на ранно-, късно-апоптотични и некротични клетки. Данните остават почти сходни с нетретираната контрола, прилагайки 10 μM EPC3 върху раковите клетки. Най-голяма разлика от 12.3кратно увеличение на фракцията от ранно-апоптотични клетки се наблюдава при третиране с 30 μM EPC3 (0.94% при контролата и 11.6% след третирането). Въпреки това се наблюдава тенденция за увеличаване на клетъчната мембранна пропускливост с повишаване на EPC3 концентрацията, като късно-апоптотичните клетки са 9.6 пъти повече спрямо нетретираните MDA-MB-231 клетки (1.85% при контролата и 17.8% след третиране с 30 μM EPC3). На 48-я час не се наблюдава значително повишаване на двойно положителната фракция от клетки (Анексин V⁺, 7-AAD⁺): 3.2% и 4% при третиране с 20 и 30 μM EPC3 и 2.88% некротични клетки в контролата (фиг.4.1.13.).



Фиг.4.1.13. EPC3-индуцирана клетъчна смърт при MDA-MB-231 клетки след 48 часова инкубация, анализирана чрез поточна цитометрия. За FACS анализа са използвани флуоресцентни маркери Анексин V-FITC и 7-AAD.

Проведените изследвания сочат, че при използване на анти-туморния агент еруфозин се индуцира преференциално апоптоза, а не некроза. След 48 часа инкубация процентът на ранно-апоптотичните клетки се увеличава средно между 6 и 20 пъти, в зависимост от клетъчната линия. Също така се наблюдава повишаване на късно-апоптотичните клетки, докато броят на некротичните остава непроменен.

В резултат на проведения FACS анализ се вижда, че еруфозинът не предизвиква некроза на MDA-MB 231 клетките с висок метастатичен потенциал при третиране за 48 часа, и че действието му е времево и концентрационно-зависимо.

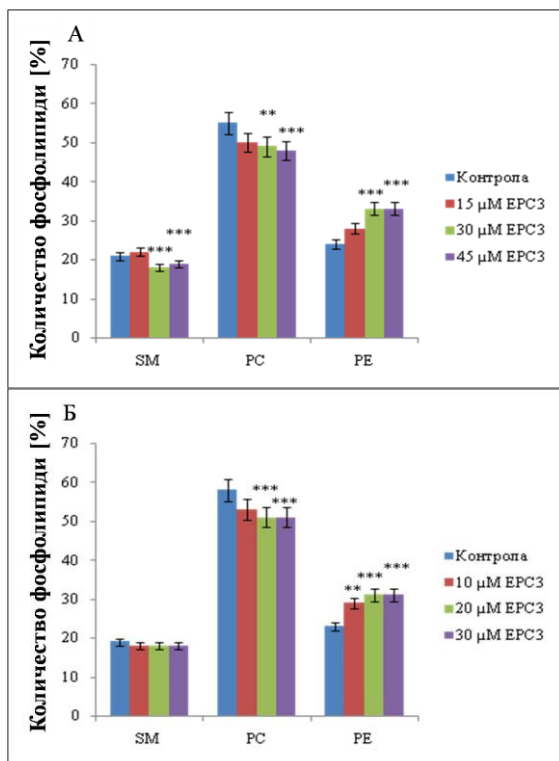
Резултатите от проведените два FACS анализа утвърждават EPC3-индуцирания клетъчен арест във фаза G2/M и значителното повишаване на апоптотичните клетки с увеличаване на концентрацията на еруфозин и времето на третиране. Също така се потвърди селективното цитотоксично действие на алкилфосфохолина към раковите клетки, като нормалните MCF-10A клетки остават по-нечувствителни към действието му [Tzoneva R., 2014; Pehlivanova V. et al., 2013^a; Пехливанова и колектив, 2012].

6. Фосфолипиден профил на EPC3-третиранни *Graffi* миелоидни клетки и клетки от рак на гърдата

Активирането на липидния метаболизъм е ранно събитие в карциногенезата и е главен отличителен белег на много видове рак. Мембраните фосфолипиди - фосфатидилхолин (PC), фосфатидилетаноламин (PE) и фосфатидилинозитол (PI), както и сфингомиелин (SM) и церамид (Cer), са главните липиди в туморите. Промените в липидния метаболизъм могат да повлияят на множество клетъчни процеси, включително клетъчен растеж, пролиферация, диференциация и подвижност и по този начин повлияването на липидния метаболизъм е привлекателна цел за лечение на раковите заболявания. Една от поставените задачи в дисертацията беше да се проследи изменението на основни липидни компоненти в клетъчната мембрана на *Graffi* клетки, както и на клетки от рак на гърдата, третирани с различни концентрации на еруфозин.

Алкилфосфохолините (APCs) се локализируют както в плазмената мембрана, така и във вътреклетъчните мембрани. Повлияват организацията на мембраната, което води до различни промени в клетъчната пролиферация и редица сигнални пътища [Kostadinova A. et al., 2015]. Според литературни данни, APCs могат да инхибират синтеза на ключови фосфолипиди като фосфатидилхолин (PC) и сфингомиелин (SM), [Jiménez-López J.M. et al., 2010], което беше наблюдавано и в получените от нас данни за *Graffi* миелоидни тумор-индуциращи клетки третирани с еруфозин – фиг.4.I.14. Количеството на SM намалява с повишаване на EPC3 концентрацията, като ефекта е

изразен преди всичко на 24-я час, докато на 48-я промяна не се наблюдава. Марсо и съавтори показват, че излагането на HepG2 клетки на действието на анти-туморния липид милтефозин инхибира метаболизма на SM в зависимост от времето на инкубация [Marco C. et al., 2009]. Нарушения в синтеза на SM водят до натрупване на церамид и сфингозин, които регулират клетъчни функции, като пролиферация, генна експресия, диференциация, митоза, клетъчно оцеляване и апоптоза. Сфингозинът и церамидът могат да индуцират апоптоза чрез вътрешния апоптотичен път, чрез модулиране пропускливостта на митохондриалната мембрана, която освобождава протеини като цитохром C [Colombini M., 2013].



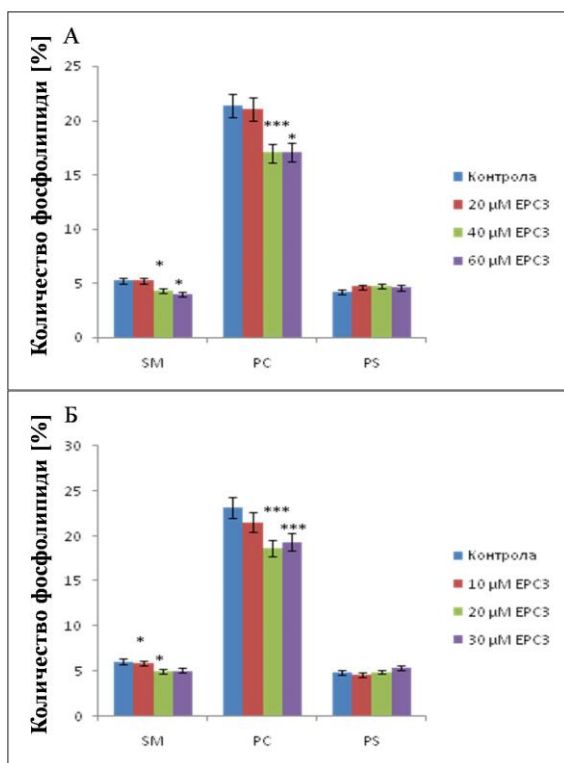
Фиг.4.1.14. Влияние на еруфозин върху нивото на сфингомиелин (SM), фосфатидилхолин (PC) и фосфатидилетаноламин (PE) в клетъчни мембрани, след А) 24 и Б) 48 часа третиране на клетки на Graffi. Статистиката е направена спрямо контролната група (синьо), чрез ANOVA one-way тест и Tukey – Kramer post test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

В мембраните на EPC3-третираните *Graffi* клетки настъпват промени свързани и с намаляване на процентното съдържание на PC. Ефектът е наблюдаван и при двете инкубационни времена. Смята се, че един от пътищата за индуциране на апоптоза в клетки третирани с алкилфосфохолини е инхибиране синтеза на фосфатидилхолина. Нашите резултати потвърждават тази хипотеза, като те показват статистически достоверно намаляване нивата на PC при миелоидните клетки третирани с еруфозин в дози от IC₅₀ (30_(24ч) и 20_(48ч) μM) и IC₇₅ (45_(24ч) и 30_(48ч) μM). Подобни изследвания показват, че милтефозинът също инхибира синтеза на PC [Jiménez-López J.M. et al., 2010]. Фосфатидилетаноламинът е изобилен фосфолипид, присъстващ във всички клетъчни мембрани и е от съществено значение за клетъчната преживяемост. Митохондриалните мембрани се състоят предимно от фосфолипидите PE и PC [Nicolson G.L., Ash M.E., 2014]. В *Graffi* клетките третирани с еруфозин се наблюдава повишаване на нивата на PE по концентрационно зависим механизъм - 1.45 пъти се повишава процентното съдържание в 45 μM EPC3-третираните клетки спрямо контролните на 24-я час и 1.3 пъти на 48-я час при клетки третирани с 30 μM EPC3 (фиг.4.I.14). Повишаване на процентното съдържание на PE създава ламеларно напрежение на мембраната. Това е важно в някои форми, които приемат мембраните, като например при клетъчно делене и/или образуването на апоптотичните телца [Somerjarju P. et al., 2009].

Количеството на отделните фосфолипиди, в пробите от третирани с EPC3 клетки от рак на гърдата, претърпява също промени. Инкубирането с еруфозин води до дозозависимо намаляване на фосфолипидите в раковите клетки. В нетретираната контрола, установените нива на PC и SM са 21%/5% за MCF-7 и 23%/6% за MDA-MB-231 клетките. Нивата на PC и SM в третираните клетки са видимо намалени (фиг.4.I.15). Например за MCF-7 клетките, третирани с 40 μM еруфозин, съотношението PC/SM е 18%/4.6%. Това представлява понижение с 1.2/1 пъти на двата фосфолипида. За MDA-MB-231 клетките съотношението на двата липида е 17%/4%, което е намаление с 1.35/1.5 пъти. И при двете клетъчни линии се наблюдава леко повишаване на нивата на PS по концентрационно зависим механизъм (около един път при съответната IC₅₀ стойност) - фиг.4.I.15. Наличието на PS значително подобрява свързването на пептиди към мембраната. Улеснява образуването на по-

големи трансмембранни пори [Leite N.B. et al., 2015]. Молекулите на EPC3 биха се концентрирали в ръба на пората, която от своя страна би могла да е част от липидния рафт в липидния бислой.

Тъй като гореспоменатите фосфолипиди са едни от основните съставки на мембраната, които поддържат целостта и функционалността ѝ, тяхното редуциране чрез третиране с еруфозин може да промени клетъчната пролиферация и миграция и по този начин да доведе до смърт на раковите клетки. По този начин, представените резултати предполагат, че мембранните фосфолипиди са подходяща цел за анти-туморно лечение с еруфозин.



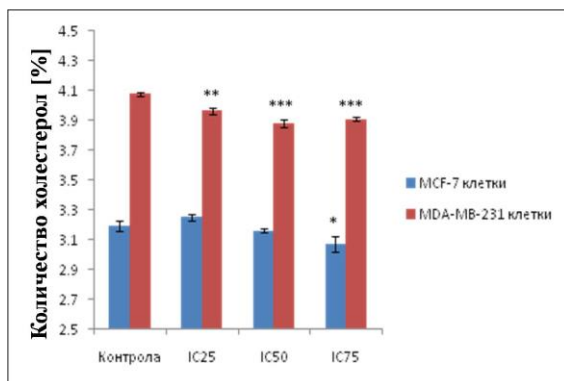
Фиг.4.1.15. Влияние на еруфозин върху нивото на фосфолипидно присъствие в клетъчни мембрани, след 24 часа третиране: А) MCF-7 клетки, Б) MDA-MB-231 клетки. Статистиката е направена спрямо контролната група (синьо), чрез ANOVA one-way тест и Tukey – Kramer post test (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$).

7. Съдържание на холестерол в EPC3-третиранни клетки от рак на гърдата

Guerra и колеги показват, че клетките от рак на гърдата проявяват значителна свръхекспресия на редица гени, участващи в биосинтетичния път на холестерола (CH) [Guerra F.S. et al., 2016]. Холестеролът е неразделна част от клетъчните мембрани, определя флуидитетът на мембраната и играе решаваща роля в нейната организация, динамика и функционалност [Maxfield F.R., Tabas I., 2005].

Разгледан беше ефектът от действието на еруфозин върху нивата на холестерол, като беше установено дозозависимо намаляване на количеството му с повишаване на EPC3-концентрацията. От фигура 4.I.16. се вижда, че в мембраните на високоинвазивната линия MDA-MB-231 се съдържа по-високо количество CH от мембраните на нискоинвазивната линия. Тези резултати са в съгласие с теорията, че високите нива на холестерол са способни да стимулират по-високата клетъчна миграция наблюдавана при MDA-MB-231 [Danilo C. et al., 2013]. Данните показват, че редуцирането на холестерола от клетките кореспондира с намаляване на клетъчната жизнеспособност (данни от МТТ анализ) и инхибиране на миграцията, което е придружено с промени в клетъчната морфология и цитоскелет. Нови наблюдения показват, че прилагането на мембранно активни APLs като еделфозин, еруцилфосфохолин и перифозин, намаляват пролиферацията на HerG2 клетки, нарушавайки трафика на холестерол от плазмената мембрана до вътреклетъчните мембрани и в резултат на това настъпва понижаване на естерификацията на холестерола [Carrasco M.P. et al., 2010].

От получените данни се установи, че третирането на MCF-7 клетките с IC₇₅ на EPC3 (60 µM) в продължение на 24 часа е способно да отстрани 4% от клетъчния холестерол, което кореспондира с високата цитотоксичност която предизвиква 60 µM разтвор на EPC3 върху клетките. При клетки MDA-MB-231, EPC3 води до намаляване от 3.2%, 5.37% и 4.63% (проценти съответно за IC₂₅, IC₅₀ и IC₇₅).



Фиг.4.1.16. Количество холестерол в клетъчни мембрани от EPC3-инкубирани MCF-7 и MDA-MB-231 клетки, след 24 часа на третиране. Статистиката е направена спрямо контролната група (нетретираните клетки), чрез ANOVA one-way тест и Tukey – Kramer post test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Високото съдържание на липиди и холестерол в раковите клетки се счита за отличителен белег на агресивността на рака [Abramczyk H. et al., 2015]. Това също така намалява флуидитета и динамиката на мембраната и повишава резистентността към приложената химиотерапия [Rysman E. et al., 2010].

Съотношението на регистрираните фосфолипиди към съдържението на холестерола при нискоинвазивните, нетретираните MCF-7 клетки е 30%/3.19%, а след инкубиране на клетките с EPC3 съотношението намалява до 25.65%/3.07%. Високометастазиращите MDA-MB-231 клетки показват 34.1%/4.08%, докато прилагане на EPC3 в дози IC₅₀ и IC₇₅ предизвиква намаляване на комплекса до 32%/3.97% и 29.75%/3.91%. Намаляване на съдържанието на холестерола с мембранно-изчерпващи агенти или инхибитори на синтеза на холестерол (например статини) спомага за моделиране на липидните рафтове [Rysman E. et al., 2010]. Евентуалното разрушаване на рафтовете може да инхибира активирането на Akt, което да намали пролиферацията на туморните клетки [Borradaile N.M. et al., 2006]. Липидните рафтове също така играят решаваща роля при разпространението на рака, чрез регулиране на цитоскелетната реорганизация и динамиката на фокалната адхезия, регулират миграцията на раковите клетки [Wang R. et al., 2013].

Холестеролът и SM са главните липидни съставки на мембранните рафтове и съотношението SM/CH е от решаващо значение за поддържане на целостта на липидните рафтове и оттук и на мембранна функционалност. И при двете клетъчни линии от рак на гърдата се наблюдава редуциране на нивата на комплекса SM/CH. При нетретираните MCF-7 клетки е 5.24%/3.19%, а след инкубиране с 60 μ M EPC3 съотношението намалява до 4.02%/3.07%. Това представлява редуциране на комплекса с 23.3%/3.76% за съответния липид. MDA-MB-231 клетките показват 6.07%/4.08% съответно на SM/CH, а след прилагане на еруфозин в концентрации 20 и 30 μ M, комплексът намалява до 5.02%/3.88% и 5.08%/3.91%. Вижда се, че концентрацията от 20 μ M довежда до най-голям процент на намаляване на SM/CH (17.3%/4.9%).

Нашите изследвания показаха промяна и в баланса между холестерола и PS, който повишава нивата си и може да е необходим за контрола на мембранный флуидитет. Промяната на флуидитета и/или липидния състав може да бъде причина за патологичното поведение на клетките [Holthuis J.C., Menon A.K., 2014].

Получените резултати могат да допринесат за по-доброто разбиране на процеса на миграция на клетките от рак на гърдата и могат да се използват при разработването на нови терапевтични стратегии, насочени към овладяване на процеса метастазиране. Изучаване на ролята на мембранный холестерол в клетъчния отговор на миграция може да допринесе за разработването на нови терапевтични стратегии, насочени към ограничаването на метастазирането на рака на гърдата, а промените на комплекса липиди/холестерол, биха ни позволили да инхибираме, чрез EPC3- индуцирана апоптоза, растежа и разпространението на тумора.

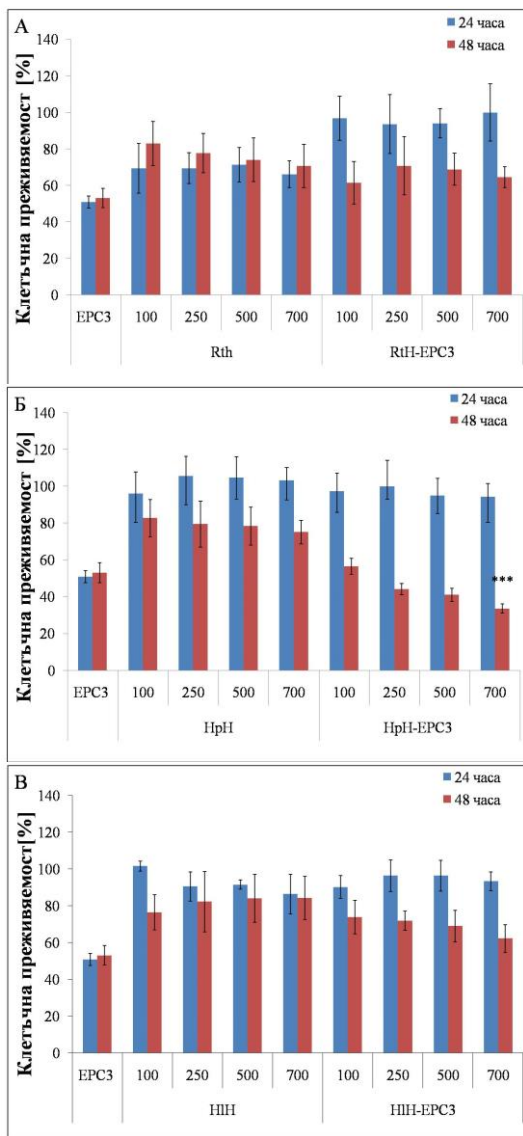
Част II. Изследване на анти-туморна активност на природни продукти – хемоцианини и техните комплекси с йонни течности и еруфозин

Значително увеличение на цитотоксичността се регистрира при комбиниране на хемоцианините с йонните течности (Ch.AAs). Това най-вероятно се дължи на промяна в конформацията поради което протеинът взаимодейства по-специфично с клетъчната повърхност, а също така и поради частичното разграждане на голям брой въглехидратни остатъци по повърхността на белтъка (данните са представени в дисертацията). На базата на МТТ проведения скрининг и FTIR-анализ на вторичната структура на получените нови хемоцианинови комплекси, НрН комплексите бяха избрани за следващите анализи по дисертацията.

1. Цитотоксичност на хемоцианини в комбинация с еруфозин

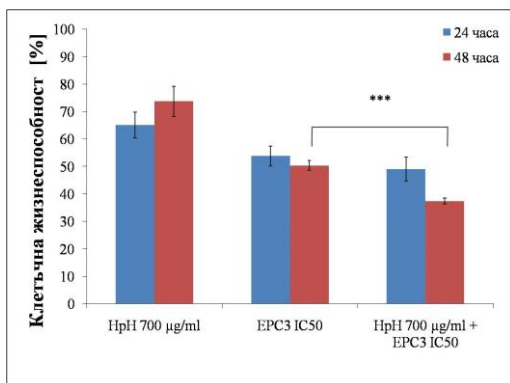
За да се установи ефективността на НрН хемоцианина за включване в адювантна анти-туморна терапия, той беше комбиниран с новия анти-туморен агент еруфозин в концентрации, еквивалентни на установените IC₅₀ стойности. Получените данни са сравнени с тези от комбинирането на други два хемоцианина - Rth и HhH. Третирането е приложено върху две клетъчни линии от рак на гърдата MDA-MB-231 и MCF-7 (фиг.4.П.1. и 4.П.2). Данните са представени в проценти спрямо негативната контрола (нетретираните клетки).

Най-голям ефект, върху тройнонегативната линия MDA-MB-231, е установен при комбинацията НрН-ЕРС3. Ефект на подпомогната цитотоксичност (адитивен ефект), беше наблюдаван при концентрация на белтъка 700 µg/ml и 20 µM еруфозин след 48 часа инкубация (фиг.4.П.1.Б). Пролиферацията намалява със 70%-та, спрямо отрицателната контрола (нетретираните клетки) и с 30%-та спрямо клетките третираните с IC₅₀ на ЕРС3. Другите два хемоцианина не показаха адитивен ефект при комбиниране с ЕРС3, въпреки че комбинираното им прилагане намалява клетъчната пролиферация на 48-я час спрямо демонстрираната на 24-я час (фиг.4.П.1.А и В).



Фиг.4.И.1. Преживяемост на MDA-MB-231 клетки третирани с хемоцианини от А) *Rapana thomasi*ана, Б) *Helix rotatia*, В) *Helix lucorum*,самостоятелно и в комбинация с ЕРС3,време на инкубация 24 и 48 часа.

На фиг.4.II.2 е представена клетъчната преживяемост на неинвазивните MCF-7 клетки след комбинирано третиране с НрН хемоцианин и еруфозин. Сравнявайки клетъчната преживяемост, наблюдавана на 48-я час, комбинацията НрН-ЕРС3 намалява с 30%-та жизнеспособността на клетките спрямо прилагане на природния НрН 700 $\mu\text{g/ml}$, докато спрямо третиране с ЕРС3 преживяемостта е с 10% по-ниска.

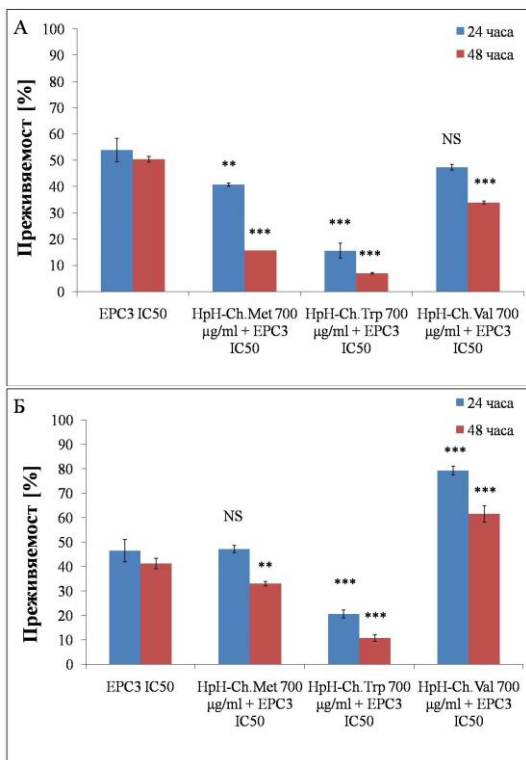


Фиг.4.II.2. Жизнеспособност на MCF-7 клетки третирани с НрН 700 $\mu\text{g/ml}$, ЕРС3 IC₅₀ (40 μM) и НрН-ЕРС3. Отделните групи са сравнени с вътрешната контрола – ЕРС3 IC₅₀, и са маркирани за значимост: *** $p < 0.001$.

Резултатите от третиране на двете ракови линии с тройния комплекс „НрН-ILs-ЕРС3” в присъствието на аминокиселините Met и Trp (представени на фиг.4.II.3.), показват адитивен ефект от добавянето на НрН-ILs към еруфозина за клетъчната цитотоксичност, най-вече при 48 часа инкубиране. По-чувствителна е нискометастиращата MCF-7 линия – фиг.4.II.3.А. Цитотоксичността нараства в следния ред НрН-Ch.Val-ЕРС3 < НрН-Ch.Met-ЕРС3 < НрН-Ch.Trp-ЕРС3. Най-голяма токсичност показва комплекс с аминокиселината триптофан, като MCF-7 клетките преживяват под 20%-та и под 10%, съответно на 24-я и 48-я час при третиране с тройния комплекс. Комплексът, съдържащ Val, показва по-слаб адитивен ефект на 48-я час, спрямо другите два комплекса, като преживяемостта намалява с 10%-та спрямо ефекта на чистия еруфозин.

MDA-MB-231 клетките остават неповлияни от действието на НрН-Ch.Val-ЕРС3, 24 часа след третирането (фиг.4.II.3.Б.). На 48-я час пролиферационната активност

намалява с 20%-та, спрямо тази на 24-я час, но остава по-висока в сравнение с преживяемостта при третиране с чистия еруфозин – средно с 20%-та. НpH-Ch.Met-EPС3 и НpH-Ch.Trp-EPС3 оказват инхибиращ (адитивен ефект) пролиферацията ефект, съответно с 15 и 40%-та на 48-я час от началото на изследването.



Фиг.4.П.3. Преживяемост на клетки третирани с тройни хемоцианинови комплекси А) MCF-7, Б) MDA-MB-231. Отделните групи са сравнени с вътрешната контрола – EPС3 IC₅₀, и са маркирани за значимост: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NS – няма статистически значима разлика.

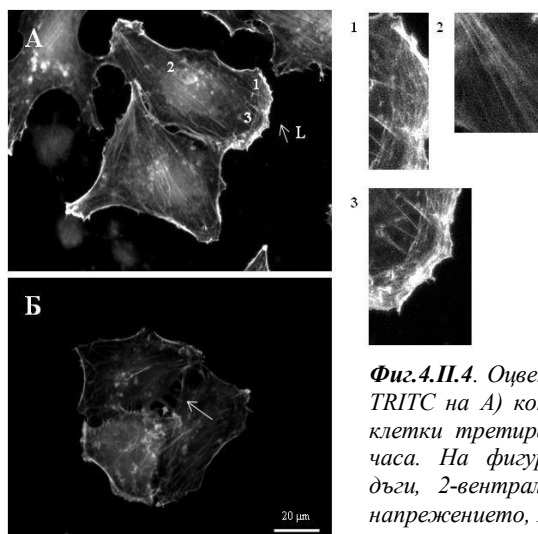
2. Изследване на актиновата цитоскелетна организация след третиране с НpH хемоцианин и неговите комплекси

Актиновият цитоскелет играе фундаментална роля в клетъчната адхезия, миграция и растеж при много физиологични и патологични процеси, като например туморното развитие [Woodhouse E.C. et al., 1997]. За да се установи дали новите комплекси

оказват влияние върху цитоскелетната организация, двете линии от рак на гърдата бяха третирани с хемоцианинови комплекси, самостоятелно и в комбинация с новия алкилфосфохолин – еруфозин.

2.1. Актинова организация при MCF-7 клетки

Клетките инкубирани за 24 часа с чистия хемоцианин показаха нормална за линията актинова организация и формиране на струпвания от клетки с индуцирани между тях клетъчни контакти – фиг.4.II.4.Б. На 48-я час от инкубирането, контролните клетки са добре разстлани и оформят по-големи струпвания от няколко клетки, отново могат да се наблюдават актинови филаменти (данните не са показани). Както се вижда от фигурата актиновия цитоскелет остава неповлиян от действието на 250 $\mu\text{g/ml}$ НрН. Представен е от по-слабо изразени стрес нишки и не добре оформени ламелоподии. Не бяха открити драстични структурни и морфологични промени в актиновия цитоскелет и след 48 часа инкубация (данните не са показани).

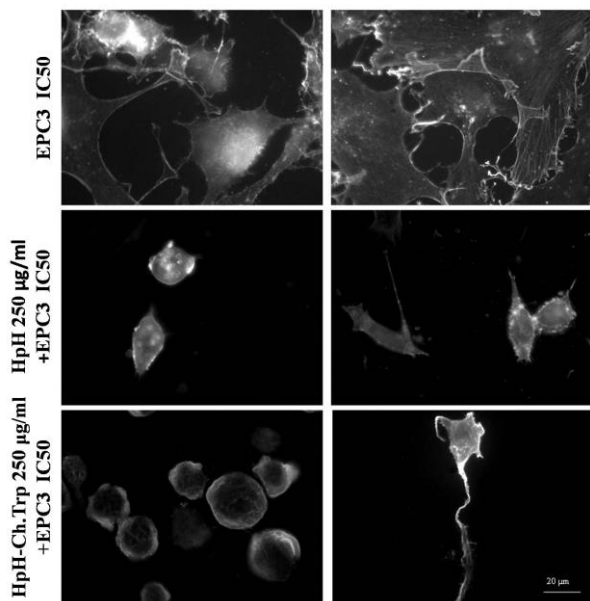


Фиг.4.II.4. Оцветяване за актин с фалоидин-TRITC на А) контролни MCF-7 клетки и Б) клетки третирани с НрН 250 $\mu\text{g/ml}$ за 24 часа. На фигурата: 1-напречни актинови дъги, 2-вентрални и 3-дорзални нишки на напрежението, L-ламелоподиум. Бар-20 μm .

При клетки третирани с еруфозин или комплексите на НрН, видимо настъпват промени в актиновия цитоскелет. IC_{50} дозата на новия анти-туморен липид засилва клетъчната адхезия, която е най-силно изразена на 48-я час (фиг.4.II.5.). Ясно се

разграничават дълги пръстоподобни образувания – филоподии, които участват в клетъчната миграция, прикрепяне към субстрата и изследване на околната среда. Промените в ламелоподиума и стрес филаментите на MCF-7 клетките показват, че третирането засяга клетъчната миграция (фиг.4.II.5.). Възможно е разрушаването на стресовите влакна да затрудни и дори да спре клетъчната миграция, защото стресовите влакна генерират и пренасят силата за придвижване от предния към задния край на клетките [Zhou G.L. et al., 2006].

Прилагането на комплексите - хемоцианин и еруфозин и хемоцианин, еруфозин и йонна течност (холинов хлорид и триптофан), предизвиква бързо разрушаване на актиновия цитоскелет, и клетките придобиват окръглена форма (среден и долен панел, фиг.4.II.5.). По същия начин индуцирането на апоптоза в HT-1080 клетки предизвиква по-малка и окръглена морфология с гладка повърхност, в сравнение с контролите [Mahdi E.J et al., 2014]. Всъщност тази закръглена морфология често се използва като маркер за идентифициране на апоптоза в клетъчната популация [Elmore S., 2007].

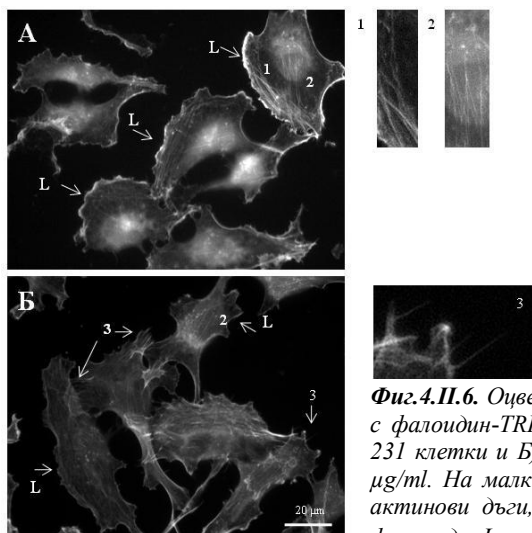


Фиг.4.II.5. Актинова цитоскелетна организация при MCF-7 клетки, третирани с 40 µM EPC3 и комбинации HrH-EPC3 и HrH-ILs-EPC3, инкубирани за период от 24 (ляв панел) и 48 часа (десен панел). Бар-20 µm.

2.2. Актинова организация при MDA-MB-231 клетки

Съществуват различни доказателства, че инвазивните ракови клетки имат променливи механични свойства. Те са по-еластични и лесно се деформират в отговор на приложените стресови стимули. Тяхната цитоскелетна подвижност се променя, като по-инвазивните клетки са по-контракtilни [Rother J. et al., 2014].

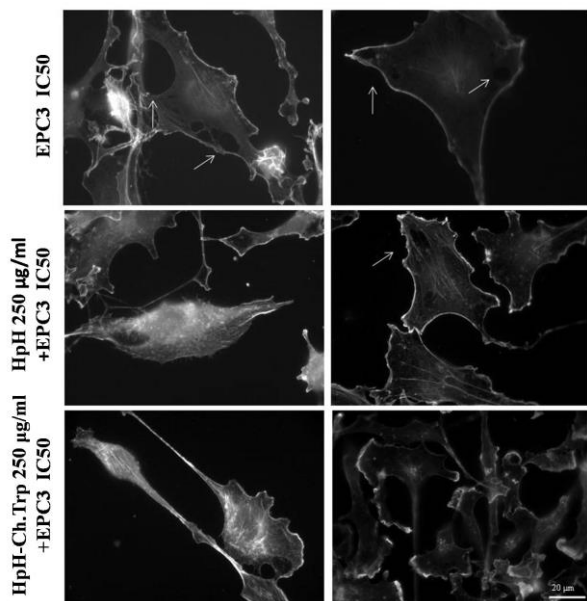
На фигура 4.П.6.А са представени нетретираните клетки от високоинвазивната клетъчна линия от рак на гърдата MDA-MB-231, демонстриращи добре развити протрузивни структури, като ламелоподии, свидетелстващи за високия миграционен потенциал на тестваните клетки. Интересно е, че в изображенията на MDA-MB-231 клетките, инкубирани с 250 $\mu\text{g/ml}$ НрН (фиг.4.П.6.Б), се вижда увеличение на броя на ламелоподиите и филоподиите. Наблюдаваната нова морфология на клетките от рак на гърдата предполага тяхната повишена подвижност в сравнение с тази на контролните клетки.



Фиг.4.П.6. Оцветяване на цитоскелетен актин с фалоидин-TRITC на А) контролни MDA-MB-231 клетки и Б) клетки третирани с НрН 250 $\mu\text{g/ml}$. На малките фигури вдясно: 1-напречни актинови дъги, 2-вентрални стрес нишки, 3-филоподи, L-ламелоподиум. Бар-20 μm .

MDA-MB-231 клетките третирани с еруфозин и комбинация НрН-ЕРС3 показват висока степен на деструкция на актиновия цитоскелет (фиг.4.П.7., бяла стрелка, долен панел), докато клетки инкубирани с тройния комплекс НрН-Ch.Trp-ЕРС3 демонстрират миграционна клетъчна морфология с множество протрузивни

структури оформящи водещ край и последващ край на клетката (фиг.4.П.7., долен панел).



Фиг.4.П.7. MDA-MB-231 клетки третиран с 20 μ M EPC3 и комбинации Hrh-EPC3 и Hrh-ILs-EPC3, инкубировани 24 (ляв панел) и 48 часа (десен панел). Клетките са оцветени с фалоидин-TRITC. Бар-20 μ m.

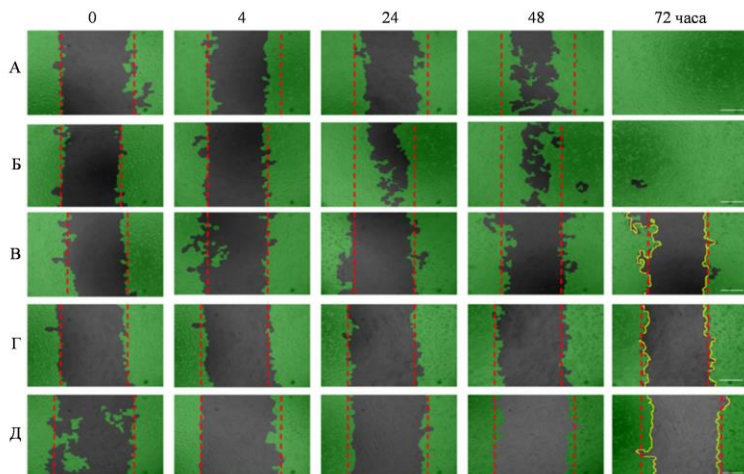
3. Изследване на миграционния потенциал на третиран туморни клетки

В литературата има данни, че анти-туморните липиди потискат клетъчната миграция. Например, милтефозинът инхибира насочената миграция и инвазивността на клетки MO-4 в *in vitro* условия [Hilgard P. et al., 1993]. Подобен ефект се наблюдава и спрямо хемотаксиса на гранулоцитите. Перифозинът потиска миграцията и адхезивната способност на миеломни клетки MM1S [Huston A. et al., 2008]. За първи път в представената дисертация беше проследена клетъчната миграция на туморни клетки третиран с еруфозин, самостоятелно и в комбинация с Hrh хемоцианин и неговия комплекс с Ch.Trp. След надраскване на повърхността на клетъчния монослой с върхчето на типче, се генерира „рана“, чието затваряне се извършва чрез миграция на пролифериращите клетки. Запълването на празното пространство от клетки беше документирано чрез снета във времето фотографии на микроскоп Olympus CK40 при увеличение на обектива 10X. В края на експеримента направените снимки бяха

анализирани чрез програмен софтуер ImageJ. Анализирана беше площта на драскотината, времето за затваряне на раната наполовина ($t_{1/2}$, h) и скоростта на миграция ($V_{\text{migration}}$, $\mu\text{m/h}$) на третираните клетки. Резултатите са сравнени спрямо тези на нетретираната контрола. Досега няма данни в литературата за комбинираното действие на еруфозин и хемоцианини, както и на комбинацията хемоцианин с йони течности, върху миграцията на адхерентни клетки от рак на гърдата.

По литературни данни миграционната способност на клетки от рак на гърдата е 300 $\mu\text{m/ден}$ (12.5 $\mu\text{m/h}$) [Langdon S.P. et al., 2004]. Фигура 4.П.8 представя данните от 72 часов анализ на „затваряне на рана“ при MCF-7 клетки. Третирането с НрН 700 $\mu\text{g/ml}$ довежда до по-бърза миграция на MCF-7 (фиг.4.П.8.Б) спрямо контролни клетки на същата линия (фиг.4.П.8.А). Скоростта на мигриране на хемоцианин-третираните клетки е сравнима с тази на нетретираните клетки през първите 24 часа. Увеличение на миграционния потенциал, т.е. по-бързо намаляване на площта на надраскване, се наблюдава за НрН-третираните клетки след 48 часа инкубация в сравнение с контролните клетки. Третирането с 40 μM еруфозин видимо инхибира клетъчната миграция, още на 24-я час (фиг.4.П.8.В). Вижда се, че надрасканата площ остава незапълнена с клетки в края на експеримента. По-силно инхибирана клетъчната миграция е заснета, след третиране на клетките с двата комплекса НрН-ЕРС3 и НрН-ILs-ЕРС3 (фиг.4.П.8.Г. и Д). На двата панела са показани снимки от началото в час 0 до края на експеримента на 72 час, на които ясно се вижда, че „раната“ не се затваря и площта остава непроменена. Представителните изображения бяха заснети с микроскоп и анализирани с помощта на интернет платформата *WimScratch*.

Инкубацията на MCF-7 клетките с чистия хемоцианин, показва скорост на затваряне на раната от 14 $\mu\text{m/h}$, докато при контролата тази скорост е 13.4 $\mu\text{m/h}$. 40 μM разтвор на еруфозин намалява два пъти скоростта до 6.71 $\mu\text{m/h}$. При такава скорост на миграция „раната“ би се затворила наполовина на 144 час (след 6 дни) от създаването ѝ. Скоростта на миграция на третираните MCF-7 клетки с комбинираните комплекси НрН-ЕРС3 40 μM и НрН-Ch.Trp-ЕРС3 40 μM са 2.12 и 3 $\mu\text{m/h}$.

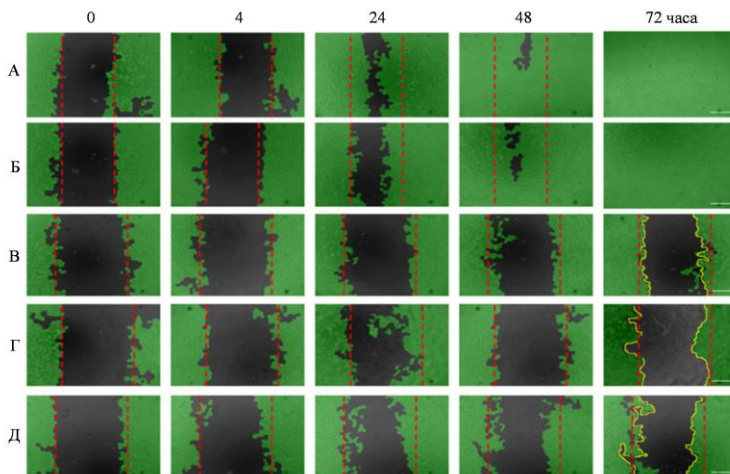


Фиг.4.11.8. 2D миграционен тест „зарастванена рана” на MCF-7 клетки. А) нетретирана - контрола, Б) MCF-7 клетки третируни с хемоцианин НрН 700 $\mu\text{g/ml}$, В) клетки третируни с 40 μM ЕРС3, Г) клетки третируни с НрН 700 $\mu\text{g/ml}$ + ЕРС3 40 μM , Д) клетки третируни с комплекс НрН-Ch.Trp 700 $\mu\text{g/ml}$ + ЕРС3 40 μM .

Данните от 72 часовия анализ при втората ракова линия MDA-MB-231, са представени на фигура 4.11.9. Подобно на нискометастатичната, и при тройнонегативната клетъчна линия, НрН 700 $\mu\text{g/ml}$ повишава клетъчната миграцията (фиг.4.11.9.Б) спрямо контролните клетки (фиг.4.11.9.А), като до 72-я час дори тези клетки затваря раната по-бързо.

Еруфозинът инхибира клетъчната миграция, като 20 μM от алкилфосфохолина намаляват скоростта до 6.2 $\mu\text{m/h}$. Скоростта на миграцията не е достатъчна за затваряне на „раната” до края на експеримента (фиг.4.11.9.В).

Инхибиране на клетъчната миграция беше наблюдавано и след третиране на клетките с НрН-ЕРС3 и НрН-ILs-ЕРС3 (Фиг.4.11.9.Г и Д). На двата панела се вижда, че драскотината не се затваря, като ефекта е подобен на този наблюдаван при MCF-7. Изчислените скорости на миграция на MDA-MB-231 клетки, инкубирани с комплексите НрН-ЕРС3 20 μM и НрН-Ch.Trp-ЕРС3 40 μM са 7 и 3 $\mu\text{m/h}$, респективно. Намалената подвижност на клетките не позволява затваряне на „раната” до края на експеримента.



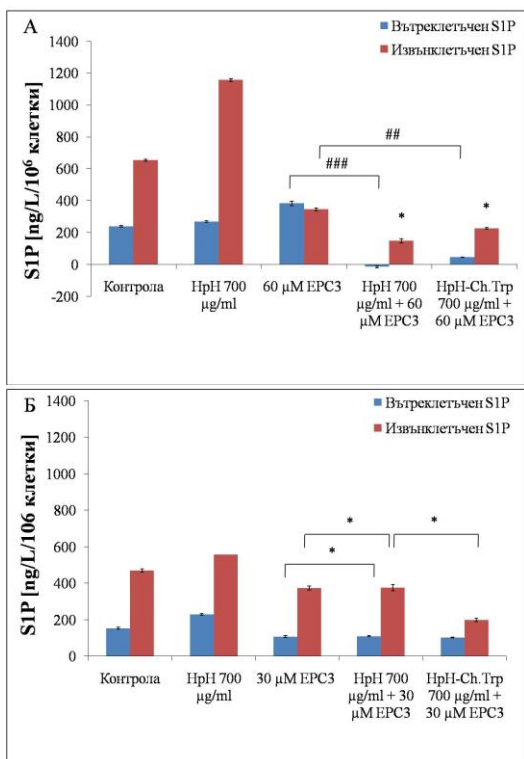
Фиг.4.11.9. „Зарастване на рана” на MDA-MB-231 клетки. А) нетретирана - контрола, Б) клетки третируни с хемоцианин Hrh 700 µg/ml, В) клетки третируни с 20 µMEPC3, Г) клетки третируни с Hrh 700 µg/ml + EPC3 20 µM, Д) клетки третируни с комплекс Hrh-Ch.Trp 700 µg/ml + EPC3 20 µM.

4. Изследване на сфингомиелинов сигнален път и експресия на пролиферативни междинни метаболитни продукти. Резултати от изследване на сфингозин-1-фосфат (S1P)

Сфингозин-1-фосфатът (S1P) е сфинголипиден метаболит и мултифункционален биоактивен липиден медиатор, който играе важна роля в регулирането на клетъчния растеж, диференциация и програмираната клетъчна смърт. Клетъчните нива на S1P се контролират както чрез неговия синтез, така и чрез разграждането му. По този начин образуването на S1P и последващото разграждане е средство за намаляване нивата на сфинголипида в клетката [Takabe K. et al., 2008]. Сфингозин-1-фосфатът има двойно действие – интрацелуларно, като вторичен посредник регулиращ пролиферацията и оцеляването на клетките и екстрацелуларно, като лиганд свързващ различни G-протеинови рецептори [van Brocklyn J.R. et al., 1998].

В настоящата дисертация за първи път са представени резултати от експресията на S1P, при клетки от рак на гърдата, след третиране с новия анти-туморен липид – еруфозин, самостоятелно или в комбинация с хемоцианинови комплекси. След 48

часа на инкубация с третиращите разтвори, количеството на вътреклетъчен и извънклетъчен сфингозин-1-фосфат беше определен чрез ELISA метод (фиг.4.II.10.).



Фиг.4.II.10. Количество на вътреклетъчен и извънклетъчен сфингозин-1-фосфат при клетки от рак на гърдата: А) MCF-7 клетки и Б) MDA-MB-231 клетки, след третиране с хемоцианин HrH, еруфозин EPC3 и комплекси: HrH-EPC3 и HrH-ILs-EPC3. Време на инкубация 48 часа. Статистиката е направена с ANOVA one-way тест и Tukey – Kramer post test (* $p < 0.001$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$).

Нетретираната MCF-7 клетъчна линия експресира ниво на вътреклетъчен S1P от 240 ng/L, а в клетки инкубирани с нативния белтък, S1P е в порядъка на 267 ng/L (фиг.4.II.10.A). Нивата на екстрацелуларен S1P в контролата и HrH-третираните клетки са съответно 653 ng/L и 1156.23 ng/L, което показва 3 и 4.3 пъти повече в сравнение с вътреклетъчния. Доказано е, че S1P усилва пролиферацията, подвижността, инвазивността и злокачественото поведение на ракови клетки [van Brocklyn J.R. et al.,

2003], ефект който косвено наблюдавахме в изследването „зарастване на рана”. При EPC3-третираните клетки се наблюдава леко повишаване на вътреклетъчните нива на S1P (383 ng/L), но екстрацелуларният намалява 2 пъти (345.2 ng/L) спрямо нетретираната група и 3.3 пъти спрямо групата инкубирана с НрН. Това би могло да обясни високата миграция и запълването на генерираната от нас рана в контролата и инкубираните с хемоцианин клетки, докато при третиране с еруфозин не се наблюдава запълване с клетки на празната площ. Интрацелуларен S1P в клетки инкубирани с комплекса НрН-EPC3 не е регистриран, въпреки това той присъства в супернатантата (147.2 ng/L) анализирана за извънклетъчно съдържание на сфинголипидния метаболит (фиг.4.П.10.А). Това може да се дължи на напускане на метаболита вследствие на нарушена плазмена мембрана. Количеството на екстрацелуларен S1P намалява с 4.4 пъти спрямо контролата и 8 пъти спрямо НрН-третираните клетки.

Когато клетъчната линия се подложи на инкубация с тройния комплекс НрН-Ch.Trp-EPC3, вътреклетъчен S1P е отчетен в рамките на 44.5 ng/L. Това представлява 5 пъти по-малко количество в сравнение с нетретираните клетки и 6 пъти спрямо инкубираните с чистия хемоцианин. Вижда се, че в сравнение с двойния комплекс, тук клетките продуцират макар и малко количество S1P вътре в клетките. Относно количеството отделено извън клетките, тенденцията на по-ниски нива спрямо контролата и НрН-третираните клетки се запазва (намалява съответно с 3 и 5 пъти). При сравняване на НрН-Ch.Trp-EPC3 с НрН-EPC3 се вижда, че тройния комплекс води до 1.53 пъти повече експресия на извънклетъчен S1P.

От анализа на резултатите се вижда, че се променя съотношението на вътреклетъчен/извънклетъчен S1P. В контролните клетки съотношението е 1:3 ng/ng, при НрН третирането - 1:4 ng/ng, EPC3 - 1:1 ng/ng, НрН-EPC3 - 0:1 ng/ng, а при НрН-Ch.Trp-EPC3 1:5 ng/ng. Голяма част от ефектите му се дължат на вътреклетъчното му синтезиране и експортирането му в извънклетъчното пространство където активира S1P рецепторите [Nagahashi M. et al., 2014]. Рецепторът S1PR1 например се свързва с G_i протеин, регулиращ различни клетъчни функции, като миграция, пролиферация, оцеляване, контакта „клетка-клетка” и ангиогенезата [Meyer zu Heringdorf D., Jakobs K.H., 2007]. В ниски концентрации най-вероятно би свързал по-малко рецептори,

откъдето може да намали миграционния потенциал и оцеляването на клетката. Промяната в съотношението, която ние наблюдавахме може да стимулира или потисне миграцията и клетъчната пролиферация или апоптозата, което потвърждава теорията на Kimura и колеги [Kimura T. et al., 2000].

От данните за MDA-MB-231 клетъчната линия (фиг.4.П.10.Б) се вижда, че клетките третираните с еруфозин, леко повишават вътреклетъчния S1P (162 ng/L) спрямо контролните (подобно на линия MCF-7), но спрямо НрН-третираните клетки претърпява намаление (за разлика от MCF-7 клетките), където настъпва редуциране на нивото на S1P с 1.4 пъти. Според някои автори натрупването на S1P в клетката, води до нежизнеспособни или много бавно растящи клетки [Struba G.M.et al., 2010].

Извънклетъчния S1P и при тази клетъчна линия намалява в зависимост от третирането (в контролата е 470 ng/L, при НрН – 557 ng/L а при EPC3 – третираните 460 ng/L). Инкубирането с двата хемоцианинови комплекса показва еднакво намаление на нивата на метаболита вътре в клетките, като най-ниско ниво е отчетено в групата подложена на третиране с комплекс НрН-Ch.Trp-EPC3 (102.2 ng/L), докато при НрН-EPC3 се достига до 109 ng/L S1P. По-голяма разлика е отчетена при сравняване на нивата на S1P извън клетката – 375 ng/L и 198 ng/L, съответно за НрН-EPC3 и НрН-Ch.Trp-EPC3. Тройния комплекс редуцира количеството на експресирания метаболит с 2.4 пъти спрямо нетретираните MDA-MB-231 клетки и с 3 пъти спрямо тези инкубирани с нативния белтък.

Ясно е, че биоактивният липиден медиатор S1P упражнява ефекти както вътреклетъчно, така и извънклетъчно. Действието на S1P вътре в клетките включват много функции, свързани с рака и други заболявания [Strub G.M. et al., 2010], като са необходими допълнителни изследвания за изясняване механизма на регулиране на клетъчните процеси чрез сфинголипидния сигнален път, насочени към SphKs и S1P продукцията, както и до неговите рецептори.

Част III. Охарактеризиране на биополимери за целите на регенеративната медицина и анти-туморната терапия

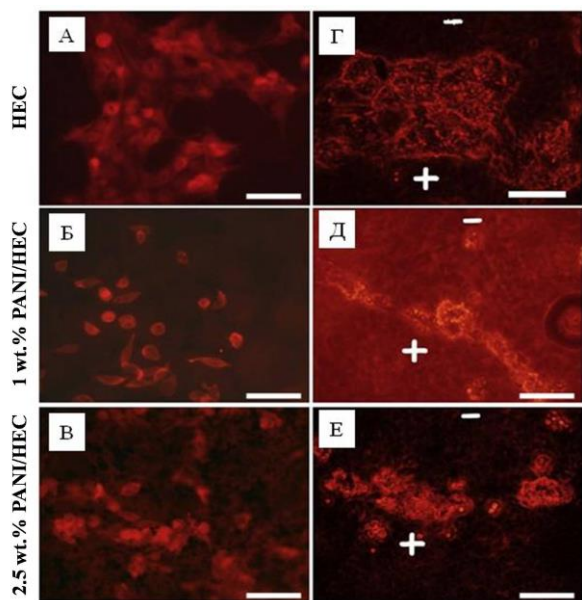
Най-важните изисквания към една матрица-носител, за да може да бъде използвана в биомедицината, са да осигури подходящ субстрат за закрепване на клетките, да индуцира добра клетъчната пролиферация имиграция, да подsigури възможност за растеж на тъканите и да стимулира клетъчен отговор. Освен това се изисква биоматериалите да бъдат биологично разградими и да могат да се резорбират чрез естествени биологични процеси. Всичко това е свързано с крайната цел - тъканна регенерация или лекарствен пренос [Khang G., 2012; Vert M. et al., 2012; Chan B.P., Leong K.W., 2008]. Синтезът на криогелове е нов подход в полимерната химия за постигане на биосъвместими полимерни материали с подходяща морфология и термохимични свойства, благоприятстващи клетъчната адхезия [Petrov P. et al., 2007], а чрез подходящо вариране на изграждащите ги материали е възможно да се осигури подходяща порьозност за имобилизиране на лекарствени препарати.

Проведеният МТТ тест показва много добра преживяемост и пролиферация на L929 клетките върху PANI/HEC нанокomпозитните криогелове, 24 часа след инкубацията. При стандартни условия преживяемостта остава висока на клетки инкубирани върху HEC материали съдържащи 1 и 2.5 wt.% PANI, съответно $130\% \pm 1\%$ и $115\% \pm 1.27\%$. Тези резултати могат да се разглеждат като доказателство за отличната биосъвместимост на HEC криогелове със съдържание на PANI 1 wt.% и 2.5wt.% (данните са подробно показани в дисертацията).

1. Оценка на биосъвместимостта на електропроводими криогелове в присъствие на електрична стимулация

Най-често биосъвместимостта на даден материал се изследва чрез оценяване на жизнеспособността, пролиферацията и адхезията на тестваната клетъчна линия [Hatamzadeh M. et al., 2016]. За да се изследва морфологията и цитоскелетната организация на L929 клетки върху различни субстрати, преди и след 24 часово електротретиране, клетките бяха фиксирани с PFA, пермеабелизирани и оцветени с фалоидин-TRITC за цитоскелетен F-актин и след това визуализирани, използвайки флуоресцентен микроскоп Leica DM3000B (Германия).

Флуоресцентната микроскопия разкри, че L929 клетките са добре адхерирали и произволно разпределени в полимерната матрица (фиг.4.III.1.А, Б и В). Няма разлика в цитоскелетната организация и плътност на клетките. Фибробластите образуват идентични струпвания, разположени на различни равнини в материалите. След прилагане на електричен стимул от 2.5 V/cm в продължение на 24 часа, фибробластите стават окръглени и подравнени в структури успоредни на линиите на електричното поле (фиг.4.III.1.Д). Тенденцията е за позициониране на тези структури в близост до анода (+). Това може да се дължи на привличането на клетките от произведените от PANI заредени „поларони” (катионни радикали), които предизвикват електрическа проводимост.



Фиг.4.III.1. Флуоресцентна микроскопия на адхерентни L929 клетки в нанокompозитни - PANI/HEC и чист HEC криогелове преди (А-В) и след (Г-Е) прилагане на електрично поле (2.5 V/cm) в продължение на 24 часа. Всички клетки са оцветени за актин фаллоидин-TRITC. Бар 50 μm .

Излагането на L929 клетките от гелове със съдържание 1% и 2.5 wt.% PANI на продължително 24 часово електротретиране чрез използване на електрично поле с физиологичен интензитет, показва стимулиране на клетъчната миграция. 1% и 2.5 wt.% съдържание на PANI показаха най-добра компактност и електропроводимост от останалите тествани материали. При по-високо съдържание на PANI се нарушава компактността на гела, материалите стават ронливи, което спомага за тяхното

разпадане при което клетките се отделят в средата. От друга страна, не се открива подреждане или промяна във формата на L929 клетките при електротретиране в чист НЕС-криогел (фиг.4.III.1.Г). Това разкрива потенциала на новите PANI-съдържащи материали и тяхната комбинация с електрично поле, за създаване на по-добрата насоченост, клетъчна ориентация и миграция, което ще спомогне за формирането на нова тъкан.

2. Степен на разграждане на PCL/PEO носител и освобождаване на анти-туморна субстанция

За да се установи потенциалът на PCL/PEO криогела, като носител с удължено освобождаване на анти-туморни агенти, бяха проведени *in vitro* изследвания върху степента на освобождаване на доксорубин (DOX) и еруфозин (EPC3). Спектрофотометрично бяха изследвани криогелове с различно съотношение на двата материала: PCL/PEO (3:1) и PCL/PEO (2:1) с вграден в тях DOX. Най-подходящ профил на удължено освобождаване на доксорубин демонстрира криогел (2:1). От началото на експеримента до 5-я ден се наблюдава линейно отделяне на агента от носителя, докато след 125 час (5 ден) освобождаването на активната субстанция навлиза в плато и това остава постоянно до края на изследването (данните са представени подробно в дисертацията). Въз основа на тези показатели PCL/PEO (2:1) беше избран и за изследване на степента на отделяне и на еруфозин. През 2008 година Lindner и колеги [Lindner L.H. et al., 2008] за първи път разработват високоскоростна течна хроматография (HPLC) в тандем-мас-спектрометричен анализ за валидиране и количествено определяне на еруфозин. Чрез прилагане на тандем-мас-спектрометричен анализ ние успешно определихме концентрацията на еруфозин, отделена от полимерната матрица PCL/PEO (2:1). Полимерът с включения в него EPC3 е поставен в DMEM клетъчна среда, от която периодично се взимат проби в продължение на 14 дни. Данните са показани на фиг.4.III.2. По генерираното уравнение на експоненциално повишаване на нивата на EPC3 в клетъчната среда се изчислява фармакокинетичното отделяне на субстанцията. Високи концентрации над 5 mg/ml EPC3 са измерени между 4-ти и 6-ти час след началото на експеримента, като на 6-я час е достигната и най-високата измерена концентрация от 5.6 mg/ml EPC3.

След този час, от фигурата ясно се вижда, че кривата навлиза в плато, което продължава до 14-я ден от експеримента, което означава, че в средата се отделя постоянно количество еруфозин.



Фиг.4.11.2. Фармакокинетика на EPC3 от PCL/PEO (2:1) носители в продължение на 14 дни.

В заключение, най-добрата матрица за удължено освобождаване на DOX и EPC3 се оказва PCL/PEO в съотношение 2:1, която съчетава най-подходящата комбинация от двата полимера за избраните анти-туморни субстанции. Въпреки бързият разпад и отделянето на висока доза от агентите в началото, впоследствие настъпва по-бавно разграждане и отделяне на анти-туморна субстанция в линейна зависимост. Това би осигурило поддържане на константна терапевтична доза при прилагането на анти-туморните агенти *in vivo*.

Част IV. In vivo изследване на анти-туморната активност на еруфозин

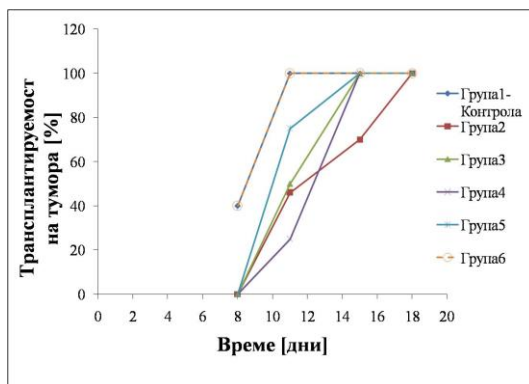
I. In vivo експериментален модел в хамстер за оценка на анти-туморната активност на еруфозин и доксорубицин

Тестваните животни бяха разпределени в шест различни групи според вида на третирането, което ще бъде приложено.

Биометричните параметри трансплантируемост, обем на тумора, смъртност и средно време на преживяемост са използвани като маркери за оценка на анти-туморната активност на изследваните субстанции.

1. Туморна трансплантируемост

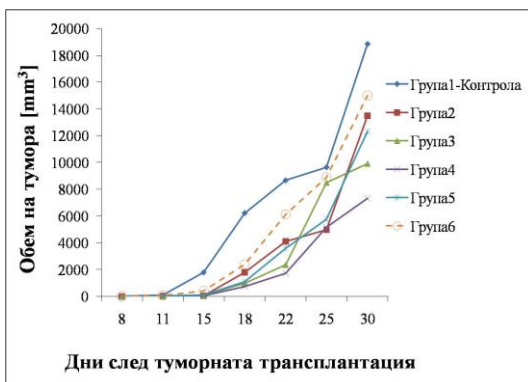
Ефектът от третирането с еруфозин и доксорубицин върху трансплантируемостта на *Graffi* тумор-носеци хамстери (ТВН) беше проследен 20 дни след трансплантацията на тумора (фиг.4.IV.1). Най-висок процент хамстери, с осезаеми тумори, се наблюдават в групи 1 и 6. Тумори са установени в 40 и 100% от експерименталните животни и при двете групи, съответно на ден 8 и ден 11.



Фиг.4.IV.1. Трансплантируемост на *Graffi* миелоиден тумор в хамстери, третирани с еруфозин и доксорубицин. Експериментални групи: Група 1 - нетретирана контрола; Група 2 - тумор носещи хамстери (ТВН), третирани с EPC3 от ден 0; Група 3 – ТВН третирани с EPC3 от ден 11; Група 4 - ТВН третирани с EPC3 и DOX от ден 0; Група 5 - ТВН третирани с EPC3 и DOX от ден 11; Група 6 - ТВН третирани с DOX от ден 0.

2. Обем на тумора

Влиянието на различни схеми на експериментална терапия върху туморния обем в *Graffi* миелоидни тумор-носеци хамстери бяха наблюдавани в продължение на 30 дни. Средният обем на тумора в нетретираната контролна група хамстери (група 1), показва бърз растеж (фиг.4.IV.2). Както се вижда от данните, представени на фиг.4.IV.2, обемът на тумора във всички експериментални групи е намален в сравнение с този на животните от нетретираната група 1 и на ТВН третирани с доксорубицин (група 6). Средният обем на туморите в хамстери, третирани с комбинация от доксорубицин и еруфозин е значително по-нисък в сравнение с нетретираната контрола (100% инхибиране на растежа на тумора в ден 8 и ден 15). Графиките са изместени надясно спрямо тези на контролите (групи 1 и 6). Оптимален ефект е наблюдаван при група 4 - хамстери, третирани с комбинация от двата анти-туморни агента, като се започне на ден 0. Обемът на тумора в тази група е най-малък във всички етапи на проучването (около 8000 mm³ до 30-ия ден).

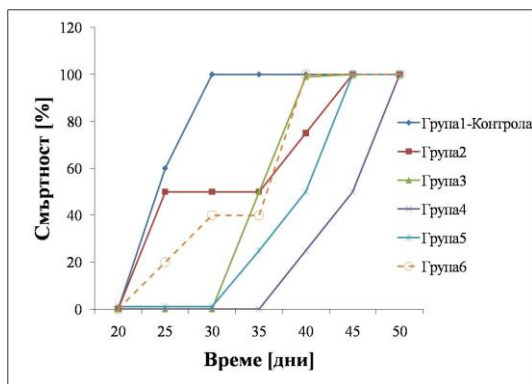


Фиг.4.IV.2. Обем на тумора при *Graffi* тумор-носеци хамстери, третирани с еруфозин и доксорубицин. Групи: както е отбелязано на фигура 4.IV.1.

3. Смъртност

Установено е намаляване на смъртността при ТВН, третирани с проучваните агенти, във всички групи между 25 и 40-ия ден от изследването, в сравнение с контролната група ТВН (фиг.4.IV.3). Значително намаляване на смъртността се наблюдава при хамстери, третирани с комбинация от EPC3 и DOX. Както се вижда от графиката, най-

ниска смъртност при животните се наблюдава в група 4, към която спадат животни третирани с двата агента като се започне от ден 0 (фиг.4.IV.3, лилаво). В тази експериментална група, 100% смъртност се наблюдава най-късно след началото на експеримента (на 50-ти ден).



Фиг.4.IV.3. Смъртност на тумор-носеци хамстери, след като са третирани с еруфозин и доксорубицин. Групите са същите, както на фигура 4.IV.1.

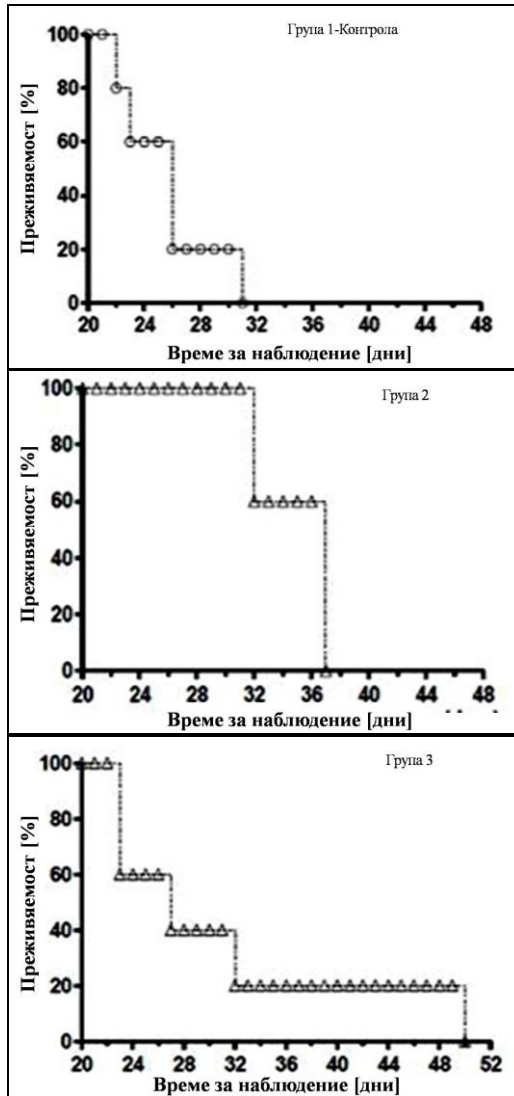
В обобщение, проведената експериментална анти-туморна терапия в създадената нова моделна система в хамстер, доведе до намаляване на биометричните параметри, като туморна трансплантируемост, обем на тумора и смъртност, както и удължаване на средното време на преживяване на третирани животни. Тези ефекти са най-ясно изразени при животни, третирани с комбинация от двата агента, и показват натрупващ анти-туморен ефект на EPC3 към DOX, приложени подкожно.

Подобни модели в плъхове и мишки са използвали много автори, изследващи анти-туморния потенциал на еруфозина [Berger M.R. et al., 1993]. При сравняване на EPC3 и перифозин, приложени интравенозно, еруфозинът се характеризира с по-широк терапевтичен индекс и антинеопластична активност, която е по-интензивна след спиране на приложението на лекарството от тази на перифозина, поради натрупване на агента в туморната тъкан. Големи концентрации на EPC3 са измерени в далак, бъбреци, бели дробове и мозък, без да е наблюдавана органна токсичност [Henke G., et al., 2009]. Съществуват опасения, поради това натрупване при една по-дълга

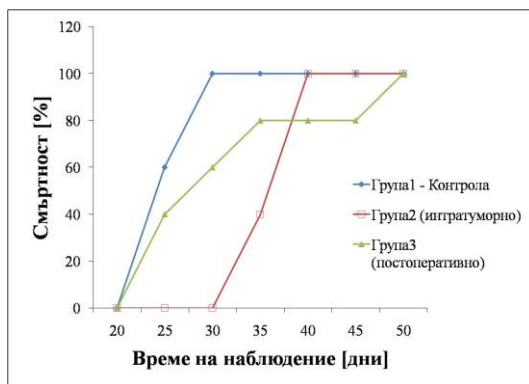
терапия, за предизвикване на органна токсичност, затова днес продължават да се търсят нови подходи за въвеждане на анти-туморната субстанция в организма.

II. Анти-туморен ефект на еруфозин от PCL/PEO носители върху трансплантируем *Graffi* миелоиден тумор в хамстери

За втория вид от изследвания, бяха избрани хамстери с добре развити туморни образувания (диаметър >1 см) разделени на три групи. В отделните експерименти хамстерите бяха на еднаква възраст (2-4 месечни) и заразени при еднакви условия. Интратуморното имплантиране на изследваните таблетки се извърши след операция, предоставяща достъп до туморната тъкан. По време на експериментите бяха определени параметрите - процент на оцеляване и смъртност на животните след имплантиране на носителите. На фигурите е представена преживяемост и смъртност на тумор-носеци хамстери без отстраняване на тумора (група 1 - контрола), с имплантация в тумора на PCL/PEO/EPIC3-таблети (група 2) и с имплантация на PCL/PEO/EPIC3-таблети в оперативното поле след отстраняване на тумора (група 3). От данните се вижда, че най-ниска преживяемост и съответно най-висока смъртност се наблюдава в контролната група – неоперирани животни. Преживяемостта в тази група е под 32 дни. При хамстерите от група 2, 60% от гризачите преживяват над 36 дни. Най-дълга продължителност на живот се наблюдава в група 3, където 20% от хамстерите преживяват 50 дни. Установено е удължаване на средното време на преживяемост при хамстерите имплантирани с PCL/PEO/EPIC3-таблети интратуморно (група 2), и хамстерите със следоперативно прилагане на таблетите (група 3) - средно 34 ± 2.7 и 30.2 ± 11.6 дни съответно, докато при контролата това време е 24.8 ± 3.5 дни (фиг.4.IV.4.). От графика 4.IV.5. се вижда, че при двете опитни групи на 25, 30 и 35-я ден след операцията се установява по-нисък процент на смъртност, който се повишава на следващите етапи и достига 100% на 40 ден за група 2 и на 50-ти ден за хамстерите от група 3.



Фиг.4.IV.4. Преживяемост на Graffi тумор-носеци хамстери третирани с EPC3 от PCL/PEO таблетки: Група 1 – нетретирани животни; Група 2 – животни с размер на тумора 1 cm, при които PCL/PEO/EPC3 таблетката се имплантира интратуморно (i.t.); Група 3 – животни имплантирани с PCL/PEO/EPC3 таблетка след хирургично премахване на тумора (размер 1 cm).



Фиг.4.IV.5. Смъртност на Graffi тумор-носеци хамстери с имплантирани PCL/PEO/EPC3-таблети. Група 1 – нетретираны ТВН, Група 2 – ТВН с PCL/PEO/EPC3-таблети имплантиран интратуморно (размер 1 cm); Група 3 - ТВН имплантирани с PCL/PEO/EPC3-таблети след хирургично отстраняване на тумора.

От получените в *in vivo* експериментални резултати се вижда, че полимерните таблетки с еруфозин, имплантирани интратуморно показват временен положителен ефект върху биометричните параметри, а именно удължена преживяемост и понижен процент на смъртност. По-добри резултати са наблюдавани в опити, при които постоперативно, в мястото на отстранения тумор, локално са имплантирани еруфозин носещите таблетки – повишена преживяемост и понижена смъртност до 50-ия ден от изследването.

Въпреки наблюдавания положителен, терапевтичен ефект на полимерните таблетки, хамстерите завършват летално поради възстановяване растежа на тумора след време. Предишни изследвания с наноструктурирани материали, чрез хистопатологични изследвания са установили, че в мястото на локално прилагане на полимерните материали при вътретуморна имплантация са формирани зони на некротични изменения в туморната тъкан в непосредствена близост до имплантирания материал. В периферията обаче се запазват туморни клетки, които осигуряват разрастване на неунищожената туморна тъкан, и водят до загиване на опитните животни в резултат на прогресивно развитие на тумора след приключване на третирането [Toshkova R. et al., 2010].

V. ИЗВОДИ

- 1) МТТ теста за цитотоксичност показва адитивен ефект на комбинацията EPC3 и DOX, като клетъчната преживяемост намалява до 50-60% в сравнение с тази при третиране с отделните вещества. Цитотоксичният ефект е клетъчно специфичен.
- 2) Комбинираното действие на еруфозин-доксорубицин и еруфозин-хемоцианинови комплекси предизвиква деструкция на протрунзивните цитоскелетни структури (филоподии, ламелоподии, формирането на Blebs “мехурчета”).
- 3) Комбинираното действие на еруфозин-доксорубицин и еруфозин-хемоцианинови комплекси води до блокиране на клетъчната миграция.
- 4) Под действие на еруфозин експресията на виментин и цитоскелетният регулатор Rho-A намалява.
- 5) Наблюдават се апоптотични промени в раковите клетки с висока степен на инвазивност при комбинирано третиране с еруфозин и доксорубицин.
- 6) Еруфозинът предизвиква задържане на клетъчния цикъл във фаза G2/M при високоинвазивната клетъчна линия MDA-MB-231, докато MCF-7 клетките преимуществено се натрупват в суб-G1 фаза.
- 7) Наблюдавани са промени в профила фосфолипиди/холестерол на EPC3-третирани ракови клетки, които могат да доведат до разрушаване на рафт-домените, които играят решаваща роля в клетъчната сигнализация отговорна за регулиране на цитоскелетната организация, мембранната цялост и функционалност.
- 8) Намаляване на количеството на S1P, нарушава баланса в “сфинголипидния реостат”, като се редуцира пролиферативния потенциал на клетките.
- 9) *In vivo* експериментите ясно демонстрират адитивен анти-туморен ефект на комбинираното третиране (EPC3 и DOX), изразен в намалена трансплантируемост, инхибиране на туморния растеж, намалена смъртност и увеличаване преживяемостта при хамстерите
- 10) . *In vivo* експериментите демонстрират увеличен анти-туморен ефект при имплантиране на полимерната матрица съдържаща еруфозин.

VI. ОБОБЩЕНИЕ

На базата на получените резултати и направените изводи може да се заключи, че еруфозинът е подходящ анти-туморен агент, както при самостоятелно прилагане, така и в комбинация с конвенционални цитостатици (доксорубидин) и природни продукти (хемоцианин), като се блокират процеси на:

- клетъчна пролиферация
- клетъчна адхезия
- клетъчна миграция

, а се стимулират процеси на:

- апоптоза
- блокиране на клетъчен цикъл

Като всичко това води до намаляване на туморната маса и метастазирането.

VII. ПРИНОСИ

1. Установен е синергичен анти-пролиферативен ефект при комбинираното прилагане на еруфозин с доксорубидин или хемоцианин на ракови клетки *in vitro*, което определя еруфозина като потенциално средство за преодоляване на множествената лекарствена резистентност.
2. Установено е влияние на еруфозина върху количеството на синтезирани белтъци подпомагащи клетъчната адхезия (Rho-A и виментин), което допринася за деструкцията на протрунзивните цитоскелетни структури.
3. Установена е промяна в липидния профил на раковите клетки след третирането им с еруфозин.
4. Установено е намаляване на клетъчната миграция на раковите клетки под действието на еруфозин, самостоятелно или в комбинация с хемоцианини.
5. Установено е намаляване в нивата на S1P, определящо намалената клетъчна пролиферация.
6. Установена е промяна в клетъчния цикъл на раковите клетъчни линии под въздействието на еруфозин, като беше наблюдавана индукция на суб-G1 фаза и G2/M клетъчен арест.

7. Установена е насочена миграция на клетки под действието на слабо електрично поле върху матрица от електропроводим полимерен материал PANI/HEC.
8. За първи път е извършено контролирано освобождаване на еруфозин в хамстери от полимерна матрица състояща се PCL/PEO.
9. Установен е адитивен анти-туморен ефект от комбинираното прилагане на еруфозин и диксорубицин *in vivo* в хамстер.

VIII. СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

• Публикации с импакт-фактор (IF):

1. **Uzunova V.**, Apostolova S., Georgieva A., Berger M.R., Toshkova R., Tzoneva R., The influence of anti-cancer agent erufosine on Graffi myeloid tumour cells behaviour. cytotoxicity and cytoskeleton reorganisation study, *Compt. rend. Acad. bulg. Sci.*, 2015, 68, 12, 1547-1552, **IF (0.233)**
2. Petrov P., Mokreva P., Kostov I., **Uzunova V.**, Tzoneva R., Novel electrically conducting 2- hydroxyethylcellulose/polyaniline nanocomposite cryogels: synthesis and application in tissue engineering, *Carbohydrate polymers*, Elsevier, 2016, 140, 349-355, **IF (4.219)**

Забелязани цитати в:

- A critical review on the prospect of polyaniline-grafted biodegradable nanocomposite, Maryam Hatamzadeh, Peyman Najafi Moghadam, Younes Beygi-Khosrowshahi, Bakhshali Massoumi, Mehdi Jaymand, *RSC Advances* 2016, 6 (107)
- Electrically conductive nanofibrous scaffolds based on poly (ethylene glycol) s-modified polyaniline and poly (ϵ -caprolactone) for tissue engineering applications, Hatamzadeh M., Najafi-Moghadam P., Beygi-Khosrowshahi Y., Massoumi B., Jaymand M, *RSC Adv*, 6, 2016, 105371-105386.
- Self-assembly, optical, thermal and electrochemical properties of bis-N-benzyl perylene diimide dye, Ozdal D., Aydinlik N. P., Bodapati J. B., Icil H., *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2016, DOI:10.1039/C6PP00348F.
- Optimization of electrical stimulation parameters for MG-63 cell proliferation on chitosan/functionalized multiwalled carbon nanotube films, Allahyari Z., Haghighipour N., Moztarzadeh F., Ghazizadeh L., Hamrang M., Shokrgozar M.A., Gholizadeh S., *RSC Adv.*, 6, 2016, 109902-109915
- Conducting polymer hydrogels, Stejskal, J. *Chem. Pap.*, 2016, Doi: 10.1007/s11696-016-0072-9.
- Polyaniline Cryogels Supported with Poly(vinyl alcohol): Soft and Conducting, Stejskal J., Bober P., Trchová M., Adriana K., Hodan J., Hromádková J., Prokeš J., *Macromolecules*, 2017, DOI: 10.1021/acs.macromol.6b02526.
- A critical review on the prospect of polyaniline-grafted biodegradable nanocomposite, M. Shahadat, M. Zain Khan, P. Fatemeh Rupani, A. Embrandiri, S. Sultana, Sh. Ziauddin Ahammad, S. Wazed Ali, T.R. Sreekrishna, *Advances in Colloid and Interface Science*, 6 September 2017.
- Humic acid particle embedded super porous gum Arabic cryogel network for versatile use, S. Sagbas Suner, N. Sahiner, *Polymers for Advanced Technologies*, 6 July 2017, DOI: 10.1002/pat.4097
- Polyaniline-deposited cellulose fiber composite prepared via *in situ* polymerization: enhancing adsorption properties for removal of meloxicam from aqueous media, F. Viana Avelar Dutra, B. Carneiro Pires, T. Aparecida Nascimento, V. Mano, K. Bastos Borges, *RSC Adv.*, 2017, 7, 12639-12649

- A Novel Electroactive Agarose-Aniline Pentamer Platform as a Potential Candidate for Neural Tissue Engineering, Payam Zarrintaj, Behnaz Bakhshandeh, Iraj Rezaeian, Behnam Heshmatian, Mohammad Reza Ganjali, Scientific Reports, 2017, 7(1)
- Synthesis of Polyaniline-Based Nanocomposite Materials and Their Biomedical Applications: From Synthesis to Biomedical Applications, Mohammad Shahadat, Shaikh Z. Ahammad, Syed A. Wazed Suzylawati Ismail, In book: Electrically Conductive Polymer and Polymer Composites, 2018, DOI 10.1002/9783527807918.ch10
- Polyaniline cryogels: Biocompatibility of novel conducting macroporous material, Petr Humpolíček, Katarzyna Anna Radaszkiewicz, Zdenka Capáková, Jiří Pacherník, Jaroslav Stejskal, 2018, Scientific Reports 8(1)

Дисертации:

- ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОСПАЕЧНЫХ БАРЬЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ БИОПОЛИМЕРОВ ПЕКТИНА И ХИТОЗАНА, Коновалова Мария Владимировна, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр, «Фундаментальные основы биотехнологии», Российской академии наук», Институт биоинженерии, Москва – 2017
3. Guncheva M., Paunova K., Ossowicz P., Rozwadowski Z., Janus E., Idakieva K., Todinova S., Raynova Y., **Uzunova V.**, Apostolova S., Tzoneva R., Yancheva D., Modification of Rapana thomasiana hemocyanin with choline amino acid salts significantly enhances its antiproliferative activity against MCF-7 human breast cancer cells, RSC Advances, 2015, 5, 78, 63345-63354, **IF (3.289)**

Забелязани цитати в:

- Hemocyanin from Shrimp Litopenaeus vannamei Has Antiproliferative Effect against HeLa Cell In Vitro, Zheng L., Zhao X., Zhang P., Chen C., Liu S., Huang R., PloS One, 19, 2016, 57-64.
- Dicationic Surfactants with Glycine Counter Ions for Oligonucleotide Transportation, Zuzanna Pietralik, Andrzej Skrzypczak, Maciej Kozak, ChemPhysChem, 2016, 17, 15
- Immunological properties of oxygen-transport proteins: hemoglobin, hemocyanin and hemerythrin, Coates C.J., Decker H., Cell MolLifeSci, 74(2), 2017, 293-317.
- Understanding the Structure and Properties of Cholinium Amino Acid Based Ionic Liquids, Olmo L., Lage-Estebanez I., López R., J Phys Chem B., 2016, 10327–10335.
- Biological Activity of Ionic Liquids and Their Application in Pharmaceuticals and Medicine, Egorova K. S., Gordeev E. G., Ananikov V. P., Chem. Rev., 2017, DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00562.
- Ionic liquids as biocompatible stabilizers of proteins, Mouhamad Reslan, Veysel Kayser, Biophysical Reviews, 2018, DOI 10.1007/s12551-018-0407-6

- **Публикации без импакт-фактор (IF):**
 1. Stoyanova T., **Uzunova V.**, Popova D., Hadzhilazarava M., Berger M.R., Momchilova A., Toshkova R., Tzoneva R., Effect of Erufosine on MDA-MB 231 Breast Cancer Cells, ScienceForecast Publications LLC., 2018, 1, 1, 1-4.
- **Доклади публикувани в сборник с трудове от национални конференции**
 1. Georgieva A., Toshkova R., Apostolova S., **Uzunova V.**, Berger M.R., Tzoneva R., In vitro antiproliferative activity of novel anti-cancer agent Erufosine on Graffi myeloid tumor cells, proceedings of the 6th workshop on experimental models and methods in biomedical research, 2015, 75-82, **ISSN 1314-9091**.
 2. Georgieva A., Toshkova R., **Uzunova V.**, Berger M.R., Tzoneva R., In vivo antitumor effect of the novel alkylphosphocholine erufosine applied alone or in combination with doxorubicin against Graffi myeloid tumor in hamsters, Biological activity of metals, synthetic compounds and natural products, Proceedings of the tenth workshop on biological activity of metals, synthetic compounds and natural products, November 16-18, 2015, **ISSN 2367-5683**.

IX. СПИСЪК С УЧАСТИЯ В НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ И СЕМИНАРИ

- **Доклади на национален форум с международно участие**
 1. A. Georgieva, R. Toshkova, **V. Uzunova**, M. Berger, R. Tzoneva, Antineoplastic and antimetastatic potential of the novel alkylphosphocholine erufosine in Graffi myeloid tumor cells. Cytocompatibility study, The 7th workshop on experimental models and methods in biomedical research, София, България, 16-18.05.2016.
 2. **Uzunova V.**, Apostolova S., Paunova K., Rainova Y., Guncheva M., Idakieva K., Tzoneva R., Potential anti-cancer effect of hemocyanins on breast cancer cells, The 6th workshop on experimental models and methods in biomedical research, София, България, 12 - 14.05.2015
- **Доклади на национален форум**
 1. **Veselina Uzunova**, Petar Petrov, Martin Berger, Albena Momchilova, Rumiana Tzoneva, Polycaprolactone/poly (ethylene oxide) cryogels as a novel drug carriers, Biomedicine and Quality of life, Sofia, Bulgaria, June 26, 2017
 2. **В. Узунова**, М. Гунчева, М. Бергер, Р. Цонева, Промени в метастатичния потенциал на клетки от рак на гърдата след третиране с еруфозин и йонни разтвори на хемоцианин от Helix Pomatia, Втори докторантски симпозиум „Молекулярната биология-нови хоризонти“, София, България, 7.04.2017
 3. **Узунова В.**, Апостолова, С., Георгиева А., Тошкова Р., Бергер М., Цонева Р., In vitro и in vivo приложения на новия алкилфосфохолин Еруфозин, Интердисциплинарен докторантски форум, София, България, 06 - 07.04.2016
 4. Georgieva I., Kostadinova A., **Uzunova V.**, Apostolova S., Momchilova A., Tzoneva R. Effect of miltefosine on cytoskeleton organization and lipid metabolism in epithelial cancer cells, 55 Years Anniversary Conference of the Roumen Tsanev Institute of Molecular Biology, Sofia, Bulgaria, 05 - 06.10.2015

- **Постери на международен форум**

1. **Uzunova V.**, M. Guncheva, M.Berger, R. Tzoneva, Synergistic combined anti-tumor effect of erufosine and hemocyanin on metastatic potential of adherent cancer cells, XXVII Международна научна конференция-65 години „Мини Марица-Изток”, Стара Загора, България, 1-2.06.2017
2. Mokreva P., Kostov I., **Uzunova V.**, Apostolova S., Tzoneva R., Petrov P., Conducting nanocomposite hydroxyethylcellulose/polyaniline cryogels for tissue engineering application, Challenges in science and technology of polymer materials, Bansko, Bulgaria, 19 - 23.05.2015
3. Vladimirova-Mihaleva L., Tanovska M.V., Tsonev P., Apostolova S., **Uzunova V.**, Tzoneva R. An impedance study of the influence of anti-cancer agent Erufosine on breast cancer cells, Regional Symposium on Electrochemistry – South East Europe, Pravets, Bulgaria, 07 - 11.06.2015
4. **Uzunova V.**, Georgieva A., Apostolova S., Ugrinova I., Toshkova R., M.R.Berger, Tzoneva R., Combined treatment of cancer cells with the new anti-neoplastic erufosine and doxorubicin, 20th World Congress on Advances in Oncology and 18th International Symposium on Molecular Medicine, Athens, Greece, 08 - 10.10.2015

- **Постери на национален форум с международно участие**

1. **Veselina Uzunova**, Ani Georgieva, Tihomira Stoyanova, Petar Petrov, Martin Berger, Albena Momchilova, Reneta Toshkova, Rumiana Tzoneva, New cryogels as carriers of anti-tumor agent Erufosine, „МЛАДЕЖКА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНО УЧАСТИЕ “КЛИМЕНТОВИ ДНИ”, 16 – 17 ноември 2017 г., Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски”, София, България
2. **Uzunova V.**, Guncheva M., Idakieva K., Berger M., **Tzoneva R.**, Hemocyanins in a combined treatment with Erufosine on breast cancer, 63-rd Scientific Conference with International Participation – Food Science, Engineering and Technology, Plovdiv, Bulgaria, 21 - 22.10.2016
3. **Uzunova V.**, Apostolova S., Georgieva A., Berger M.R., Toshkova R., Tzoneva R. Investigation of the apoptotic potential of the novel anti-cancer agent erufosine on Graffi myeloid tumor cells, Юбилейната научна конференция: 20 години Тракийски университет, Стара Загора, България, 19 - 20.05.2015

- **Постери на национален форум**

1. Raynova Y., Idakieva K., Guncheva M., **Uzunova V.**, Ossowicz P., Janus E., Angelov I., Tzoneva R., Hemocyanin from *Rapana thomasiana* – structure and anti-breast cancer activity in a presence of cholinium amino acid ionic liquids, 9th National Conference of Chemistry, Sofia, Bulgaria, 29.09.2016 - 01.10.2016
2. **Uzunova V.**, Stoyanova T., Berger M., Momchilova A., Tzoneva R., Membrane phospholipids as useful target for anti-tumor treatment with Erufosine, III-ти

Национален конгрес по физически науки, София, България, 29.09.2016 - 02.10.2016

3. **Uzunova V.**, Ugrinova I., Berger M., Tzoneva R. Application of biphasic electric pulses and erufosine on breast cancer cells, Първа национална конференция по Биотехнология - 30 години Биотехнология в България, София, България, 17 - 18.10.2014