



Българска академия на науките

Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей

Секция „Патология“

Милена Митева Главчева

**“ЦИТОТОКСИЧНА АКТИВНОСТ НА НОВОСИНТЕЗИРАНИ МЕТАЛНИ
КОМПЛЕКСИ С ШИФОВИ БАЗИ И КОДЖИКОВА КИСЕЛИНА И НА
СТАТИНИ ВЪРХУ ТУМОРНИ КЛЕТКИ”**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

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

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Научна специалност: Морфология (шифър: 01.06.26)

Научен ръководител: проф. Радостина Ивайлова Александрова, доктор

София, 2020 г.

Дисертационният труд е обсъден и допуснат до защита на разширено заседание на секция „Патология“ на ИЕМПАМ-БАН, състояло се на 17 декември 2020 г.

Материалите по защитата на дисертационния труд са на разположение в ИЕМПАМ-БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 25А.

СЪДЪРЖАНИЕ

1. Въведение в проблематиката и актуалност на изследването	4
2. Цел и задачи.	6
3. Материали и методи.	7
4. Резултати.....	15
Комплекси на Z(II) с Шифови базин	16
Комплекси на Cu(II) с Шифови базин	23
Комплекси на Zn(II), Co(II) и Ni(II) с коджикова киселина	29
Статини	36
5. Обсъждане	44
6. Изводи	55
7. Справка за приносите в дисертационния труд	56
8. Заключение	57
9. Списък на научните публикации във връзка с дисертацията.....	58
10. Участия в научни форуми и проекти по темата на дисертационния труд.....	59
11. Благодарности за сигурена подкрепа и сътрудничество.....	65

1. ВЪВЕДЕНИЕ В ПРОБЛЕМАТИКАТА И АКТУАЛНОСТ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

Проблемът, към разрешаването на който настоящият труд претендира да допринесе, е постигането на терапевтичен напредък чрез откриването на нови агенти, активни срещу широката и разнородна група от заболявания, обозначавани общо като онкологични (от гръцки език „oncos“ – маса, израстък) или туморни (от латински език “tumor” – подутина). Те притежават свойството да развиват патологична хипербиоза, изразяваща се във възникване, размножаване и натрупване на нецелесъобразни клетки в организма, които формират новообразувания („neoplasma“).

Туморните образувания са изключително разнородни по своя тъканен произход, морфология и генетика, но няколко съществени характеристики разделят еднозначно туморите в две подгрупи, като открояват пред учени и терапевти сложната, нерешена задача на лечението на онази агресивна част - малигнените тумори, проявяващи неконтролируема пролиферация, тъканна инвазия, лимфо-хематогенна миграция и генетична изменчивост, наричана още „рак“. Именно към тази група тумори са насочени изследванията, проведени в настоящия дисертационен труд.

Огромно брой нови терапевтични подходи за лечение на раковите заболявания са разработени в резултат на съвместните усилия на учени и терапевти, на база на дългогодишни изследвания и тяхното прилагане в лечебната практика. Въпреки това, комплексният характер на злокачествените онкологични заболявания продължава да поставя пречки пред лечението, които могат да бъдат преодоляни със създаването на лекарствени агенти, способни да се противопоставят на характерните хетерогенност и изменчивост на туморните клетки, на механизмите на туморно самовъзпроизводство чрез стволови ракови клетки и на множествената лекарствена устойчивост. Постигането на тези цели е свързано, от една страна, с решаването на проблема за минимизиране на страничните токсични ефекти на потенциалните терапевтици и преодоляването на биологичните бариери на лекувания организъм, от друга. Успешното разработване на нови агенти за лечение на раковите заболявания, които да отговорят на изброените цели, ще предложи нова перспектива за ефективно и щадящо пациента лечение. Съществен потенциал в това отношение показват комплексните съединения на някои есенциални метали елементи с различни лиганди, включително Шифови бази. Редица шифови бази и особено техни метални комплекси притежават заслужаващи внимание биологични свойства, включително антитуморни. Популярността на тези съединения се дължи на химичната им структура,

характеризираща се с висока функционалност (повече от една реактивоспособни функционални групи), която предоставя възможност за разнообразни химични модификации. Това позволява на техните производни съединения да атакуват едновременно множество молекулни клетъчни мишени.

Есенциалните метали и техни съединения са интегрална част от регулацията на ключови физиологични процеси и модификатори на биологичния отговор. Нарушената им бионаличност и равновесие при бозайниците води до предразположеност към възникване и развитие на злокачествени заболявания. Тяхната естествена биологична роля, както и умелото им «вграждане» в дизайна на по-сложни химични съединения, особено такива с аминокиселини, е предпоставка за по-слаба токсичност и повишен клетъчен афинитет.

В посока на постигането на биологична съвместимост, още един кандидат за задълбочени изследвания като потеницален противотуморен агент е коджиковата киселина. Със своя естествен произход тя притежава много добра биологична поносимост, която се очаква да нарасне в съединенията ѝ с есенциални метали. Нарастващ обем от обещаващи изследвания върху съединения на коджиковата киселина дават основание да се разширят изследванията върху антитуморните свойства на това природно съединение.

От друга страна, химични съединения, вече утвърдени в терапевтичната практика за лечение на заболявания, различни от раковите, демонстрират обещаващи перспективи за пренасочване (“repurposing drugs”) като химиотерапевтици в онкологията. Такава е групата на статините, приета като стандарт при лечение на хиперхолестеролемия, но с все още частично проучена антитуморна активност.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационния труд бе да се проучи влиянието на новосинтезирани метални [Zn(II), Cu(II), Co(II), Ni(II)] комплекси с шифови бази и с коджикова киселина и на статините Ловастатин и Флувастатин върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия клетки от две от най-често срещаните неоплазии при жените – рак на гърдата и карцином на шийката на матката и върху трансформирани с вируси (птичи левкозни и саркомни ретровируси) животински туморни клетки.

За постигането на тази цел си поставихме следните задачи:

- Да се определи влиянието на изследваните вещества върху преживяемостта / пролиферативната активност и да се определи тяхната цитотоксичност (ЦК₅₀, ЦК₉₀) върху моделни клетъчни системи;
- Да се проследи наличието на цитопатологични изменения в култивираните в присъствие на изпитваните съединения туморни клетки;
- Да се идентифицира типа клетъчна смърт (апоптоза и/или некроза);
- Да се сравни въздействието на изследваните съединения върху преживяемостта / пролиферативната активност на туморните и нетуморни клетки;
- Да се проучи ефектът на изследваните вещества върху способността на туморните клетки да образуват триизмерни (3D) колонии в полутечна среда.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. МАТЕРИАЛИ

3.1.1. Реактиви и консумативи

При провеждането на експериментите използвахме следните материали:

- Хранителна среда D-MEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) и фетален телешки серум (ФТС), закупени от Gibco-Invitrogen (Великобритания);
- Тиазол блу тетразолиум бромидът и агарът са от Sigma-AldrichChemie GmbH (Германия);
- Диметилсулфоксидът (DMSO), неутралното червено, кристал виолетът, трипановото синьо, пропидиевият йодид (PI), акридин оранжът (АО) и трипсинът са получени от AppliChem (Германия);
- Еозинът, както и реагентите за определяне на пролиферативната активност на клетките чрез установяване на изявата на Ki67 (Ready to Use Monoclonal Mouse Ab Clone MM1, Novolink Polymer detection system) са закупени от Leica (САЩ);
- Реагентите за идентифициране на типа клетъчна смърт (апоптоза или некроза) Annexin V Apoptosis Detection Kit, са произведени от фирмата Immuno CRUZ (САЩ);
- Всички останали използвани химикали с висока степен на чистота са осигурени от местни доставчици;
- Стерилната пластмасова посъда и филтрите за стерилизиране на среди и разтвори (с размер на порите 0.2 μm) са доставени от Orange Scientific (Белгия).

3.1.2. Изследвани съединения

3.1.2.1. Метални комплекси

3.1.2.1.A.1. Метални комплекси с Шифови бази

- 7 комплекса на Zn(II) (четири броя) и Cu(II) (три броя) с Шифови бази, получени при кондензационна реакция между 2,6-диформил-р-крезол (diald), и аминокиселините β -аланин (β -alanine = alan), α -валин (α -valine = val), L-левцин (L-leucine = leuc) и фенилаланин (phenylalanine = phenylalan) (Табл. 1, Фиг. 1 - 3).

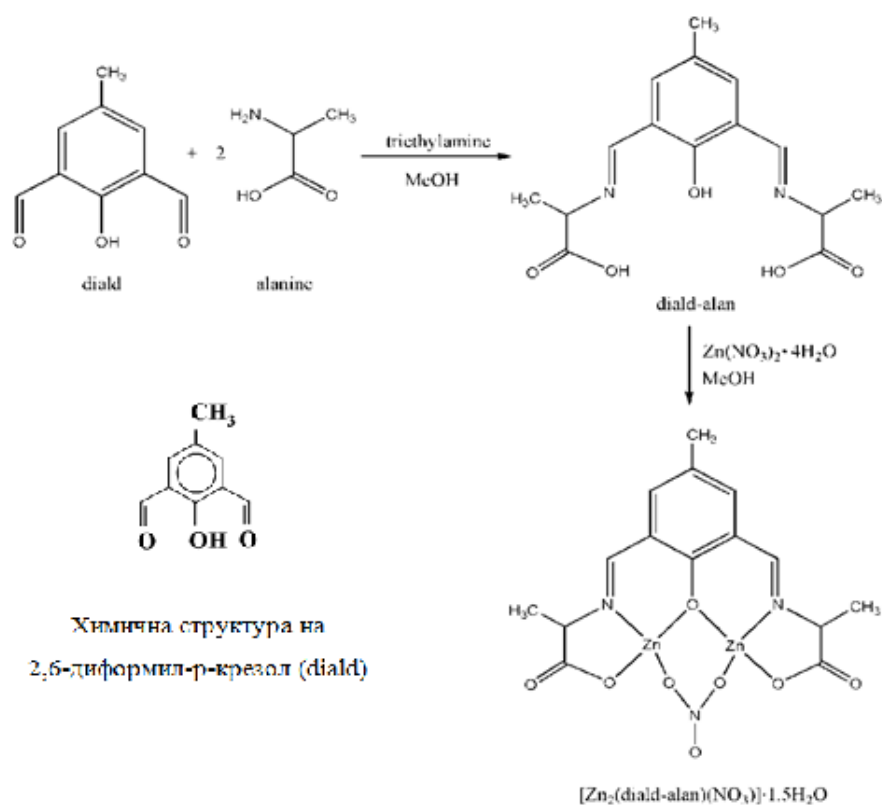
3.1.2.1.A.2. Метални комплекси с коджикова киселина

❖ 3 комплекса на коджикова киселина - с Zn(II), Co(II) и Ni(II) (Табл. 1, Фиг. 4).

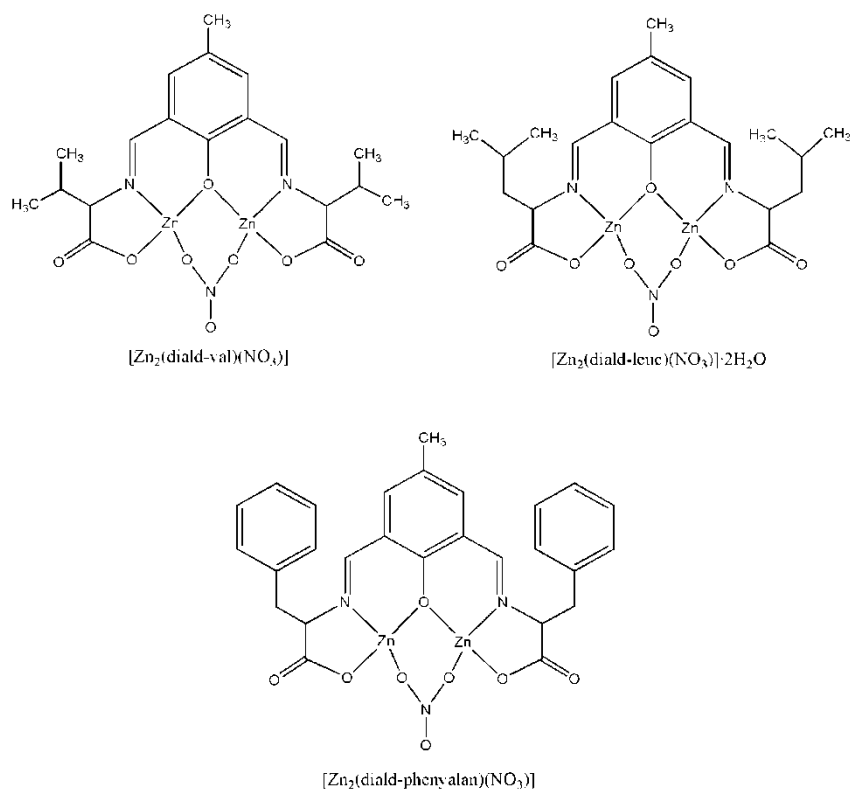
Таблица 1. Комплекси на Zn(II), Cu(II), Co(II) и Ni(II) с шифови бази или коджикова киселина

Съединение	Работно означение	Молекулна маса (g/mol)
Комплекси на Zn(II) с Шифови бази		
[Zn ₂ (diald-alan)(NO ₃)] · 1.5H ₂ O	ZnDA	M _w = 522.78
[Zn ₂ (diald-leuc)(NO ₃)] · 2H ₂ O	ZnDL	M _w = 615.78
[Zn ₂ (diald-val)(NO ₃)]	ZnDV	M _w = 551.78
[Zn ₂ (diald-phenylalan)(NO ₃)]	ZnDP	M _w = 647.78
Комплекси на Cu(II) с Шифови бази		
[Cu ₂ (diald-alan)(NO ₃)] · 2H ₂ O	CuDA	M _w = 529
[Cu ₂ (diald-leuc)(NO ₃)]	CuDL	M _w = 577
[Cu ₂ (diald-val)(NO ₃)] · 3H ₂ O	CuDV	M _w = 603
Комплекси на коджикова киселина		
[Zn(Koj) ₂ (1,10-phen)]	ZnKoj	M _w = 527.83
[Co(Koj) ₂ (1,10phen)] · 2CH ₃ OH	CoKoj	M _w = 585.43
[Ni(Koj) ₂ (1,10-phen)]	NiKoj	M _w = 521.43

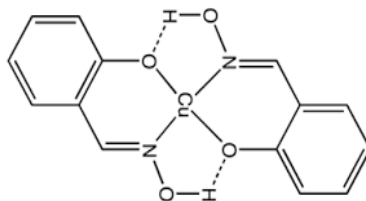
Пояснения към Табл. 1.: Diald = 2,2'-bipyridine; MeOH = CH₃OH; alan = β-аланин; val = L-валин; leuc - L-левцин; и phenylalan = фенилаланин; Koj = kojic acid; 1,10-phen = 1,10-phenanthroline. С означенията diald-alan; diald-val; diald-leuc и diald-phenylalan са наименовани комплексите на Zn(II) и Cu(II) с лиганд Шифови база, получени при кондензационна реакция между 2,6-диформил-р-крезол (diald) и съответно - β-аланин (alan); L-валин (val); L-левцин (leuc) и фенилаланин (phenylalan).



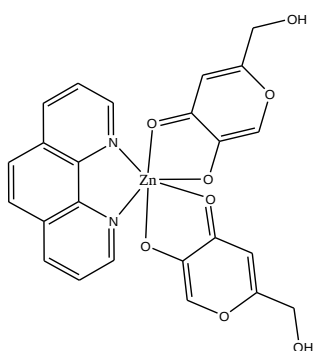
Фигура 1. Синтез на комплекса $[Zn_2(\text{diald-alan})(NO_3)] \cdot 1.5H_2O$ с Шифова база, получена при кондензационна реакция между 2,6- диформил-р-крезол (diald) и β-аланин (alan).



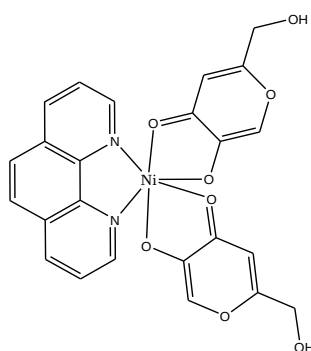
Фигура 2. Структурни формули на комплексите $[Zn_2(\text{diald-val})(NO_3)]$, $[Zn_2(\text{diald-leuc})(NO_3)] \cdot 2H_2O$ и $[Zn_2(\text{diald-phenylalan})(NO_3)]$.



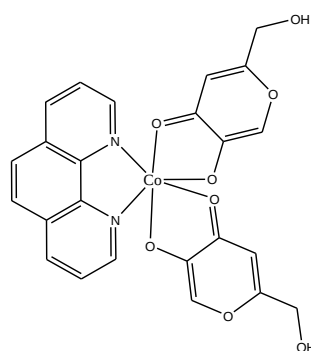
Фигура 3. Комплекс на Cu(II) с шифови бази



$[Zn(Koj)_2(1,10-phen)]$



$[Ni(Koj)_2(1,10-phen)]$



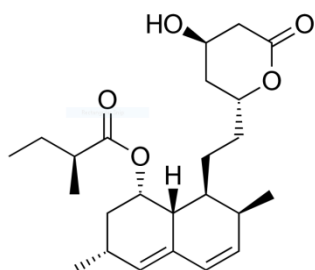
$[Co(Koj)_2(1,10phen)] \cdot 2CH_3OH$

Фигура 4. Комплекси на Zn(II), Co(II) и Ni(II) с коджикова киселина

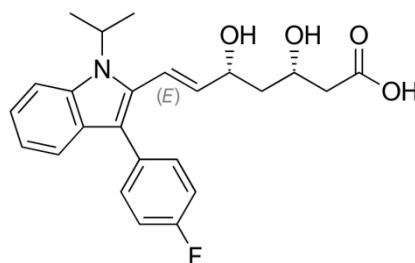
Представените метални комплекси са синтезирани и охарактеризирани (химични и физикохимични свойства) от групата на проф. Луминица Патрон от Института по физикохимия „Илие Мургулеску”, Румънска академия на науките, гр. Букурещ, Румъния. Тяхната биологична (цитотоксична / антитуморна) активност върху клетъчни култури се изследва за пръв път в рамките на този дисертационен труд.

3.1.2.Б. Статини

Двата изследвани статина са лекарствени агенти, утвърдени в клиничната практика като терапевтици при хиперхолестеролемия под наименованията Ловастатин (Фиг. 5) и Флувастатин (Фиг. 6)



Фигура 5. Ловастатин



Фигура 6. Флувастатин

3.1.2.В. Подготовка на материалите за работа

Изпитваните метални комплекси (описани в т. 3.1.2.А.1. и 3.1.2.А.2.), както и статините Флувастатин и Ловастатин бяха разтворени първоначално в диметилсулфоксид, след което разредени в хранителна среда. Крайната концентрация на DMSO в изходния разтвор (където концентрацията на съответното вещество е 1 mg/mL) беше 2%. Разтворите бяха съхранявани в хладилник при 4°C и използвани не по-късно от 2 седмици след тяхното разтваряне.

3.1.3. Клетъчни култури

Експериментите са проведени с три постоянни клетъчни линии, получени от две от най-честите неоплазии при жените: рак на гърдата (MCF-7 и MDA-MB-231) и карцином на шийката на матката (HeLa). С цел получаване на сравнителни данни в част от експериментите използвахме нетуморна клетъчна линия от 3-месечен човешки ембрион (Lep-3). В изследванията бяха включени и две животински клетъчни линии, получени от трансплантируеми тумори, предизвикани с птичи онкогенни ретровируси - LSR-SF(SR) и LSCC-SF(Mc29) - клон E7. Използваните като моделни системи клетъчни култури са представени в Табл. 2.

Таблица 2. Клетъчни култури, използвани при експериментите

Произход	Наименование	Вид	Получена от	Вирус, с който са трансформирани клетките (онкоген)
Човек	HeLa	T	Карцином на шийката на матката	HPV – тип 18 (E5, E6, E7)
	MCF-7	T	Луминален тип А рак на гърдата	-
	MDA-MB-231 (или MDA)	T	Тройно негативен рак на гърдата	-
	Lep-3	HT	3-месечен човешки ембрион	-
Плъх	LSR-SF(SR) (или RST)	T	Трансплантируем сарком у плъх	Rous sarcoma virus щам Schmidt-Ruppin (SR-RSV) (v-src)
Кокошка	LSCC-SF(Mc29) - клон E7	T	Трансплантируем хепатом у пиле	Вирус Mc29 (v-myc)

T = туморна кл. линия; HT = нетуморна кл. линия

Клетъчната линия LSCC-SF-Mc29 и нейните клонове са създадени и охарактеризирана от проф. Радостина Александрова. Според данните от проведените проучвания клетките от клон E7 се отличават с най-високо провирусно съдържание, пролиферативна активност в култура и туморогенен потенциал *in vivo* (Александрова, 2008).

Клетъчна линия LSR-SF-SR (RST) е получена и охарактеризирана от доц. д-р Ивайло Александров, д-р (Александров, 1996) и се поддържа в ИЕМПАМ от групата на проф. Радостина Александрова, доктор.

Всички клетъчни линии, върху които са проведени експериментите, са получени от Банката за клетъчни култури и вируси на ИЕМПАМ-БАН.

Сравнителни данни за някои от основните биологични характеристики на клетките от линии MCF-7 и MDA-MB-231 са представени в Табл. 3.

Таблица 3. Основни биологични характеристики на клетките от линии MCF-7 и MDA-MB-231

Клетъчна линия/ Показател	MCF-7	MDA-MB-231
Рецептори за естроген	+	-
Рецептори за прогестерон	+	-
Рецептори за Епидермален растежен фактор (HER-2)	-	-
Ген p53	Див тип	Мутантен
Инвазивност	По-ниска	Висока
Молекулярно биологичен подтип	Луминален тип А	Тройно негативен

3.2. МЕТОДИ

3.2.1. Работа с клетъчни култури

3.2.2. Определяне на клетъчна жизнеспособност

3.2.2.1. Тест за оцветяване с трипаново синьо

3.2.2.2. Определяне на въздействието на изследваните съединения върху клетъчната преживяемост

- Оцветяване с тиазол блу тетразолиум бромид (MTT тест)
- Тест за включване на неутрално червено (Neutral red uptake cytotoxicity assay - NR)
- Оцветяване с кристалвиолет (CV)

3.2.3. Определяне на клетъчна пролиферация чрез изследване експресията на ядрения белтък Ki-67

3.2.4. Определяне на способността на изследваните съединения да предизвикват цитопатологични изменения в третираните клетки.

- Светлинномикроскопски наблюдения върху клетъчния монослой
- Оцветяване с хематоксилин и еозин
- Комбинирано оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид (АО/PI).

3.2.5. Изследвания върху генотоксичната способност на веществата

Провеждане на електрофореза на единични клетки в агарозен гел (Кометно изследване) при неутрално рН (за доказване на двойноверижни скъсвания в ДНК)

3.2.6. Идентифициране на типа на клетъчната смърт – апоптоза и/или некроза – с помощта на Annexin V Apoptosis Detection Kit (произведен от фирмата Immuno CRUZ, САЩ)

- FACS анализ
- Флуоресцентна микроскопия

3.2.7. Изследване върху способността на изследваните съединения да повлияват върху 3D колонии-образуващата способност на туморните клетки

3.2.8. Статистическа обработка на експерименталните данни

3.2.9. Обработка на снимковия материал - с помощта на Photoshop CS 5.1 Extended.

4. РЕЗУЛТАТИ

Редица Шифови бази и техни метални комплекси притежават доказани антитуморни свойства, а също така и антибактериална, антивирусна, антимикотична, противопаразитна биологична активност.

Есенциалните елементи Zn(II), Cu(II), Co(II) участват в регулацията на ключови биологични процеси, необходими за нормалното функциониране на човека и животните. Те представляват неотменна част от организма на човека, като модификатори на биологичния отговор, което предполага, че проявяват значително по-ниска потенциална токсичност от тази на платината.

А. Метални съединения

А1. Краткосрочни експерименти с монослойни култури

Изследвано беше влиянието на 10 новосинтезирани комплекса на Zn(II), Cu(II), Co(II) и Ni(II) с лиганди Шифови бази или коджикова киселина, разделени условно в три групи, съобразно тяхната химична структура (Табл. 1), върху преживяемостта и пролиферативната активност на постоянни клетъчни линии, получени от две от най-често срещаните злокачествени новообразувания у жените (от рак на гърдата и карцином на шийката на матката), както и трансформирани с ретровирус плъщи саркомни и птичи хепатомни клетки. Използваните като моделни системи клетъчни култури са представени в Табл. 2. Сред са и нетуморни ембрионални човешки фибробластoidни клетки.

Изследваните вещества бяха приложени в концентрации 5 – 200 µg/ml в продължение на 24, 48 и 72 часа, а при някои експерименти и за 3, 6, 12 или 120 часа. Влиянието върху клетъчната преживяемост и пролиферативна активност беше проследено чрез МТТ тест, който е утвърден златен стандарт при определяне на цитотоксичност на вещества, а в някои случаи и чрез методите за включване на неутрално червено (NR) и/или оцветяване с кристал виолет (CV). Експерименталните данни бяха получени при едновременно провеждане на три различни метода при равни

експериментални условия. Различните мишени при трите метода – редуциране на жълто оцветения thiazolyl blue tetrazolium bromide от митохондриалния ензим сукцинат дехидрогеназа до оцветен в лилаво формазан при МТТ теста; оцветяване на киселите органели на клетката от алкалното багрило неутрално червено (NR) и прикрепянето към ДНК на багрилото кристал виолет (CV) дават база за добра сравнителна оценка на оценяваните клетъчни характеристики.

На основата на измерените осреднени експериментални данни от цитотоксичните тестове бяха построени криви „концентрация – отговор“, с чиято помощ бяха изчислени (където беше възможно) концентрациите (в $\mu\text{g/ml}$ и μM), при които преживяемостта на третираните клетки намалява с 50% (IC_{50}), респективно с 90% (IC_{90}). С тяхна помощ бяха построени йерархични редове, отразяващи цитотоксичната активност на веществата.

Цитопатологичните изменения оценявахме чрез оцветяване с хематоксилин и еозин, както и с акридин оранж и пропидиев йодид. С помощта на имуноцитохимича реакция беше визуализирана експресията на маркера за клетъчна пролиферация Ki-63.

A.1.1.Метални комплекси с Шифови бази

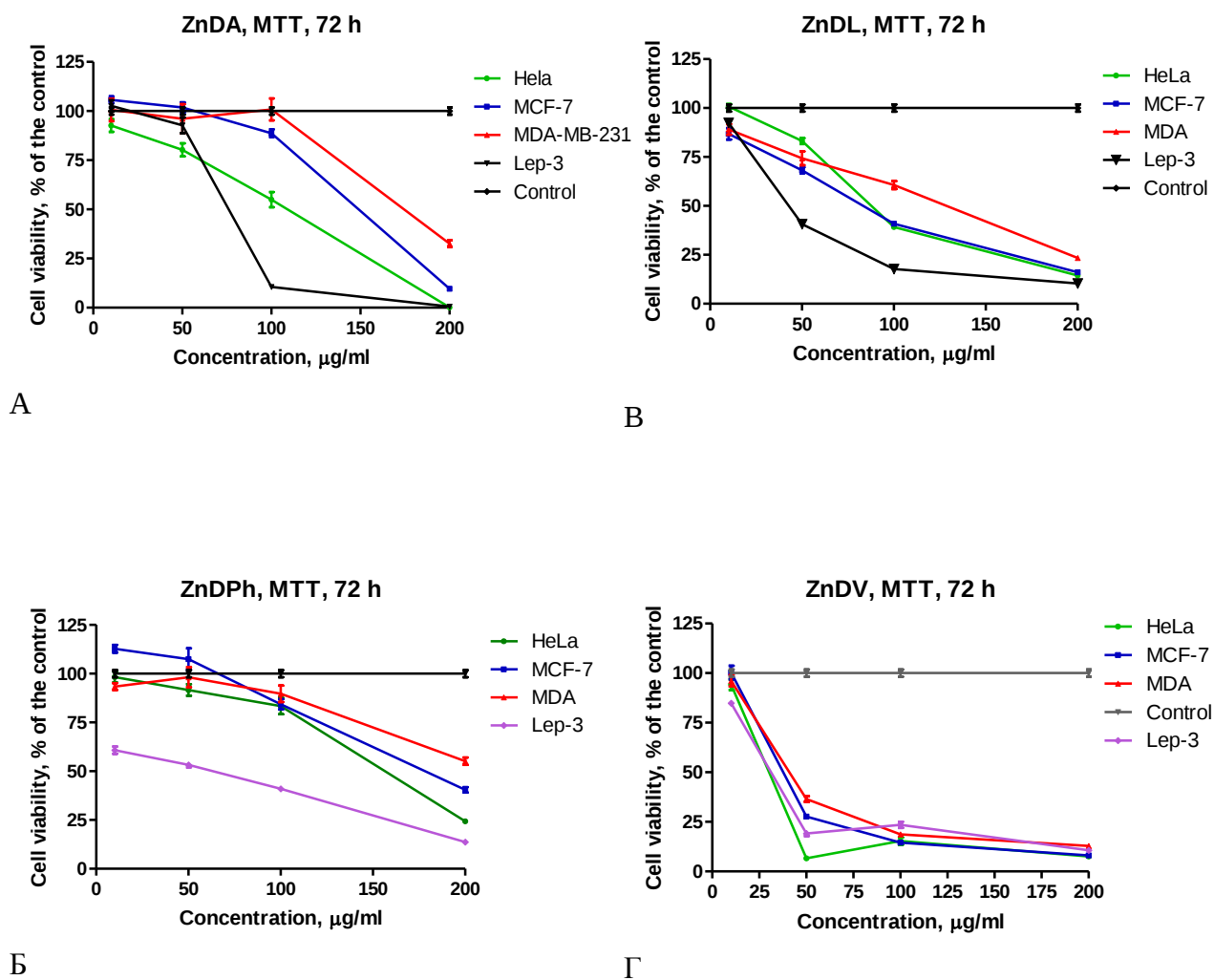
Шифовите бази са клас органични съединения, които притежават двойна връзка между въглероден и азотен атом ($-\text{C}=\text{N}-$), позволяваща им да координират и стабилизират различни метали. Техните свойства привличат интерес като лиганди в антитуморни съединения със способността си да реагират едновременно с различни молекулни мишени в клетката. Тази тяхна способност е обусловена от наличието на повече функционални групи. В съединения с металните комплекси Шифовите бази засилват своята биологична (антитуморна) активност.

A.1.1.1. Комплекса на Zn(II) с Шифови бази

Изследвани са четири новосинтезирани комплекса на Zn(II) с Шифови бази (Табл. 1, Фиг. 1 и 2). Част от получените резултати са представени на Фиг. 7-10 и Табл. 4 - 6.

Всички изпитвани съединения понижаваха в различна степен преживяемостта и / или пролиферативната активност на използваните като експериментални модели клетъчни линии, предизвиквайки в тях характерни цитопатологични изменения и клетъчна смърт. Цитотоксичният ефект се усилва с повишаване на концентрацията и

времето на въздействие. Най-силно изразена цитотоксична активност проявява комплексът ZnDV.



Фигура 7. Въздействие на комплекси на Zn(II) с Шифови бази – Zn(DA) (А), ZnDPh (Б), ZnDL (В) и ZnDV (Г), върху преживяемостта и/или пролиферативната активност на човешки туморни (HeLa, MDA-MB-231, MCF-7) и нетуморни (Lep-3) клетки след третирането им в продължение на 72 часа. Проучването е проведено чрез МТТ тест.

Таблица 4. Цитотоксична активност (ЦК₅₀ и ЦК₉₀) на комплекси на Zn(II) с Шифови бази върху клетки от линия HeLa

Метален комплекс	HeLa					
	72 ч.					
	MTT		NR		CV	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM
ZnDA	135.9* (196.1)**	259.9 (375.0)	147.4 (191.9)	282.0 (367.2)	159.8 (n.o)	305.6 (n.o)
ZnDL	46.9 (n.o)	76.1 (n.o)	33.7 (n.o)	54.7 (n.o)	89.7 (n.o)	145.7 (n.o)
ZnDV	30.4 (76.54)	55.1 (138.7)	76.5 (199.4)	138.7 (361.3)	31.2 (98.0)	56.6 (177.6)
ZnDP	170.5 (n.o)	263.2 (n.o)	n.o (n.o)	n.o (n.o)	n.o (n.o)	n.o (n.o)

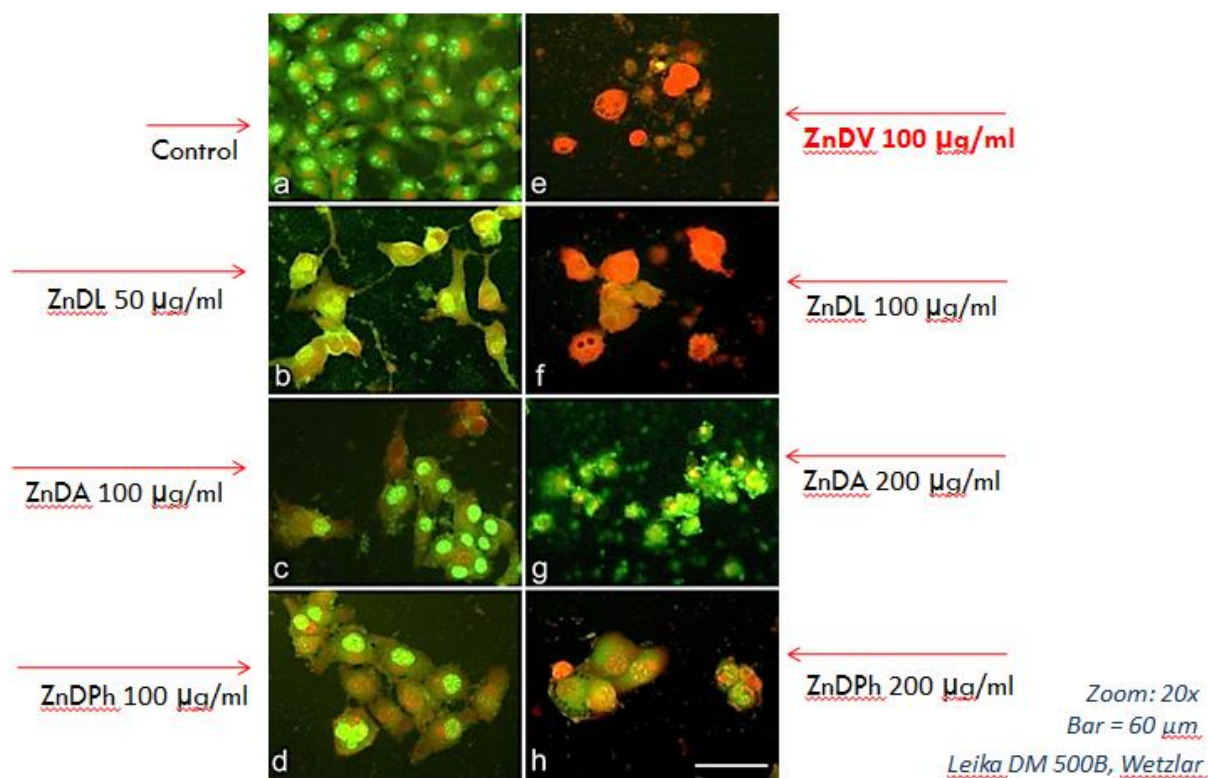
MTT = MTT тест; NR = оцветяване с неутрално червено; CV = оцветяване с кристал виолет;
 *ЦК₅₀ и **ЦК₉₀ (в скоби) - концентрациите (µg/ml и µM), при които процентът на живите клетки намалява с 50%, респективно с 90%, в сравнение с нетретираната контрола; С н.о. (не е определена) са означени случаите, при които данните за преживяемостта на клетките не са позволили определянето на ЦК₅₀ и ЦК₉₀.

Таблица 5. Йерархични редове на комплекси на Zn(II) с Шифови бази, отразяващи способността им да намаляват преживяемостта на третираните туморни и нетуморни клетки

Йерархични редове на активност на цинкови комплекси	
МТТ, 72 ч. от началото на третирането, (μM)	
LSCC-SF(Mc29)	
ZnDV > CisPt > ZnDL > ZnDA > ZnDPh	
LSR-SF-SR	
CisPt > ZnDV > ZnDL > ZnDPh > ZnDA	
HeLa	
CisPt > ZnDV > ZnDL > ZnDA > ZnPh	
Lep-3	
CisPt > ZnDV > ZnDL > ZnDPh > ZnDA	

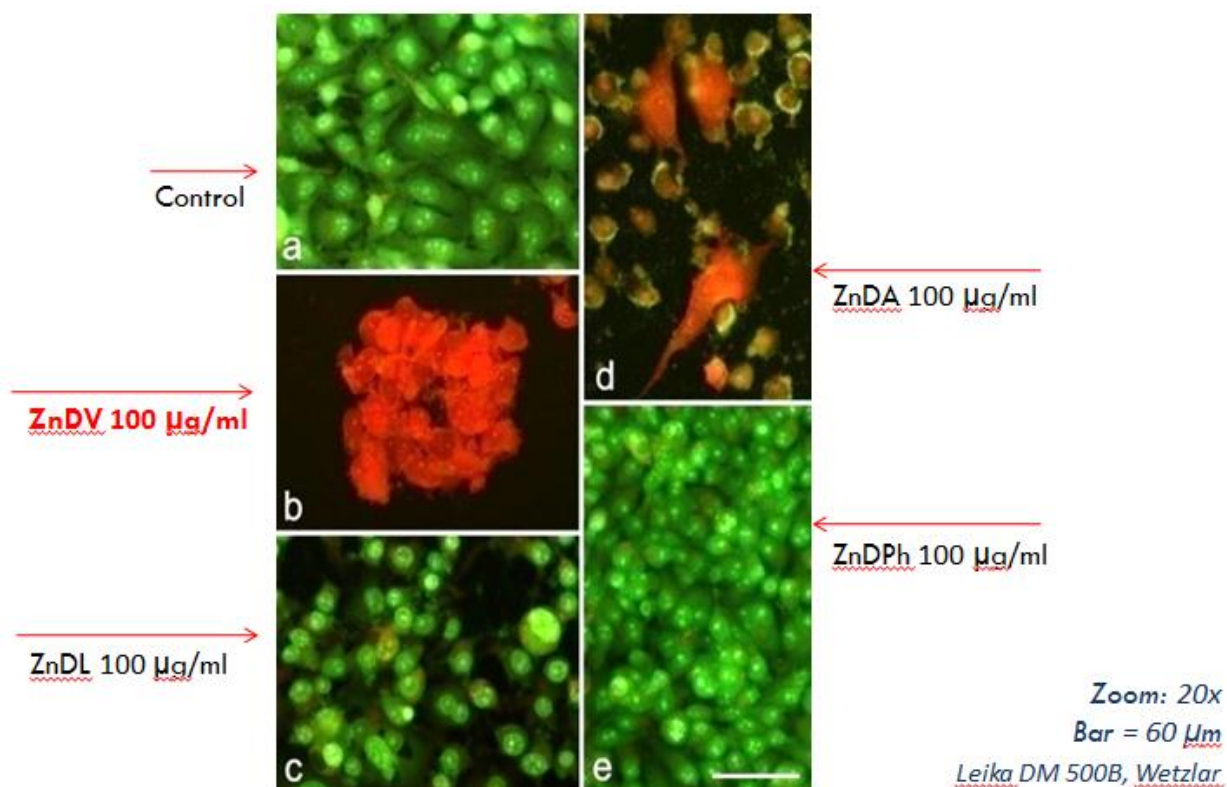
CisPt = Цисплатина; Изпитваните вещества са подредени (в низходяща последователност според способността си да намаляват преживяемостта / пролиферативната активност на третираните клетки) въз основа на цитотоксична концентрация ЦК₅₀ (μM), определена чрез МТТ тест след въздействие в продължение на 72 часа.

Цитотоксичният ефект на цисплатината е установен при други проучвания на нашата група (Дякова, 2019; Dinev et al., 2020) и не е обект на представения дисертационен труд. Информацията е включена тук с цел провеждане на сравнителен анализ.



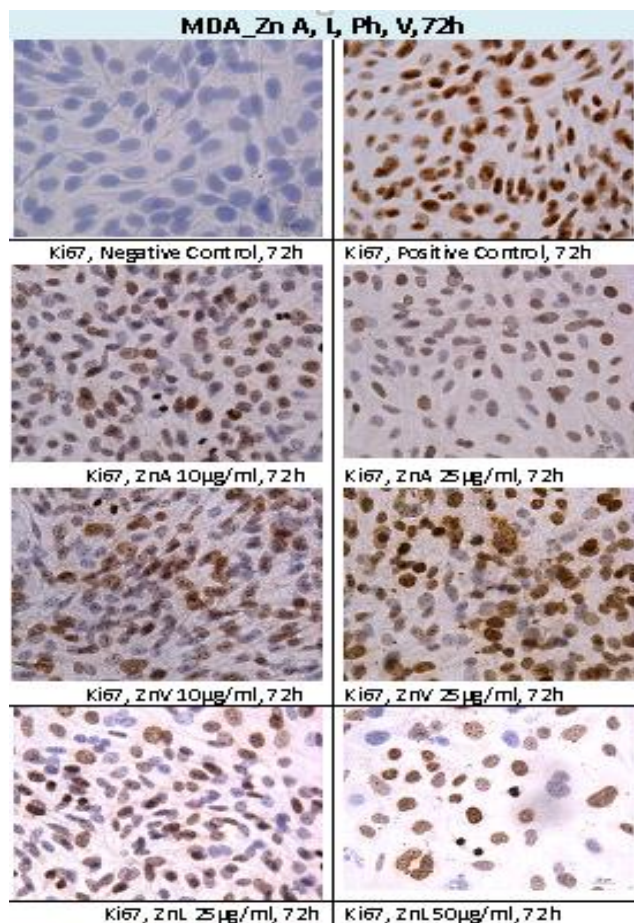
Фигура 8. Нетретираны клетки от линия HeLa (Контрола) (a); Клетки от линия HeLa, култивирани в продължение на 72 часа със следните Zn(II) комплекси:

(b,f) ZnDL в концентрации 50 $\mu\text{g/ml}$ и съответно 100 $\mu\text{g/ml}$; (c, g) ZnDA в концентрации 100 $\mu\text{g/ml}$ и 200 $\mu\text{g/ml}$; (d, h) ZnDP в концентрации 100 $\mu\text{g/ml}$ и 200 $\mu\text{g/ml}$; (e) ZnDV в концентрация 100 $\mu\text{g/ml}$. Двойно оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид (АО/PI). Микроскоп Leica DM 5000B, Leica, Microsystems, Германия, Бар = 60 μm



Фигура 9. (а) Контрола от нетретирани клетки от линия MDA-MB-231; Клетки от линия MDA-MB-231, култивирани в продължение на 72 часа със следните комплекси на Zn(II): (b) ZnDV в концентрация 100 µg/ml; (c) ZnDL в концентрация 100 µg/ml; (d) ZnDA в концентрация 100 µg/ml; (e) ZnDP в концентрация 100 µg/ml. Двойно оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид (АО/PI). Микроскоп Leica DM 5000B, Leica, Microsystems, Германия, Бар = 60µm.

При проведено имуцитохимично изследване на експресията на маркера за пролиферативна активност Ki67 в клетките от линия MDA-MB-231 (тройно негативен рак на гърдата) наблюдавахме зависим от времето на третиране спад в пролиферативната активност и различна степен и вид морфологични изменения, нарастващи с увеличаване на концентрацията при всички използвани концентрации (Фиг. 10).



Фигура 10. Клетки от линия MDA-MB-231 – негативна контрола (която не е инкубирана в присъствие на антитяло срещу Ki-67) и позитивна контрола (клетките не са третирани с изпитваните цинкови комплекси). Клетки от линия MDA-MB-231 култивирани 72 часа в присъствието на ZnA (10 µg/ml и 25 µg/ml), ZnDV (10 µg/ml и 25 µg/ml) и ZnDL (25 µg/ml и 50 µg/ml). Имуноцитохимична реакция с поликлонално антитяло срещу Ki-67, визуализация с хромоген DAB (Diaminobenzidine).

Микроскоп Leica DM 5000B, Leica Microsystems, Германия, Бар = 20µm

С някои от съединенията (ZnDA) беше проведена електрофореза на единични клетки (от линия MDA-MB-231) в агарозен гел (Comet assay). Кометното изследване беше изпълнено при неутрално pH, което позволява да бъде установена способността на изпитваните вещества да предизвикват двойноверижни скъсвания в ДНК молекулите на култивираните в тяхно присъствие клетки. ZnDA беше приложен за 24 часа при клетките от тройно негативен рак на гърдата при човек в концентрация 175 µg/ml (отоговаряща приблизително на определената с МТТ тест при същите условия ЦК₅₀). Наличие на такива ДНК увреждания в третираните клетки в сравнение с контролата не беше установено. Сравнителни данни за цитотоксичния ефект (МТТ тест), генотоксичния ефект (Кометно изследване при неутрално pH) и идентифицирането на типа на клетъчната смърт – апоптоза / некроза (Annexin V/ FITC – FACS) на това съединение са представени на Табл. 6.

Таблица 6. Обобщени данни за цитотоксичната / генотоксичната активност на комплекса ZnDA

Комплекси (концентрация)	MTT % мъртви спрямо К	Annexin V/FITC			Кометно изследване, неутр. рН
		Общо умъртвени чрез апоптоза и некроза клетки, %	Апоптоза, %	Некроза, %	% комети*
Staurosporine (2.5 μ M)	-	25	11.04	13.96	47.22
ZnDA (175 μ g/ml)	50	37.24	31.03	6.21	-

Клетките са култивирани 24 часа в присъствие на изследваните вещества, чиято концентрация е посочена в скоби. Стауроспоринът е използван като индуктор на апоптоза. Клетъчната преживяемост е установена чрез МТТ тест (MTT). Типът на предизвиканата под въздействие на веществата смърт (апоптоза, некроза) е определен чрез Annexin V/FITC метод. Способността на веществото да предизвиква двойноверижни скъсвания в ДНК молекулите на третираните клетки е анализирана чрез електрофореза на единични клетки в агарозен гел (Comet assay) при неутрално рН. *Процентът комети представлява % клетки спрямо контролата, в чиято ДНК са настъпили такива увреждания. К = Контрола.

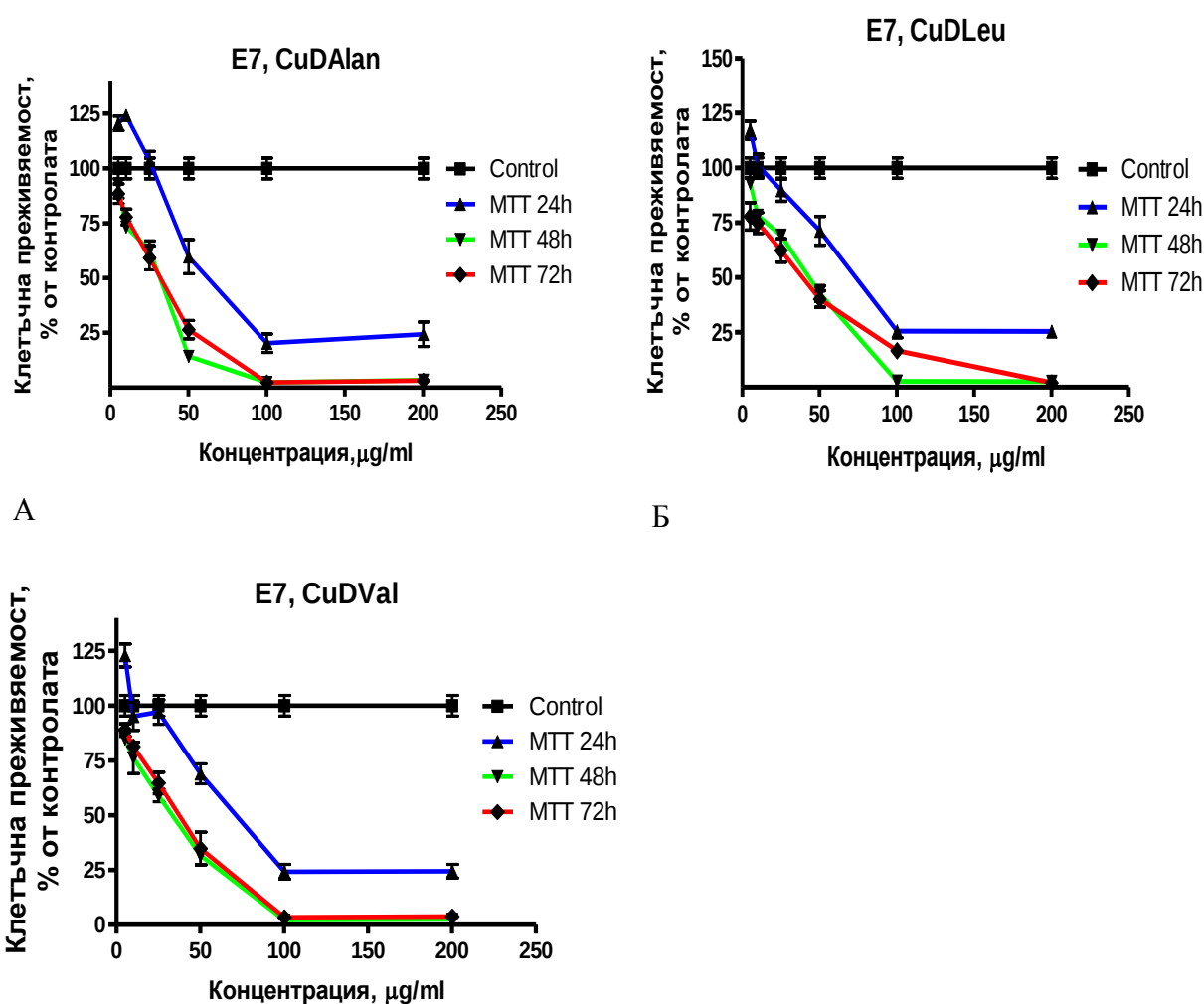
А.1.1.2. Комплекси а Cu(II) с Шифови бази

Експерименталните данни, представящи резултатите относно цитотоксичния ефект на изследваните комплекси на Cu(II) с Шифови бази демонстрираха способността на тези съединения да понижават преживяемостта и пролиферативната активност на използваните като моделни системи клетъчни линии LSCC-SF-Mc29 клон E7 и HeLa, и нетуморната Lep-3 като ефектът е време- и концентрация-зависим.

С най-висока цитотоксична активност по отношение на човешките карциномни клетки (HeLa) се отличава комплексът CuDV (според данните, получени чрез МТТ, потвърдени от метода за включване на неутрално червено), а при птичите хепатомни клетки (LSCC-SF-Mc29 клон E7) – CuDA (според резултатите, получени чрез МТТ и багрене с кристал виолет) и CuDV (с тест за включване на неутрално червено). Едновременното провеждане на трите метода с различни молекулни/клетъчни мишени

и механизми на действие (MTT, NR, CV) при равни условия доведе до получаване на сходни резултати и при двете клетъчни линии (LSCC-SF-Mc29 клон E7 и HeLa). Получените резултати са обобщени на Фиг. 11 и 12 и Табл. 7 и 8.

Цитопатологичните изменения в клетките от линия HeLa, предизвикани под въздействие на приложените за 72 часа комплекси на Cu(II) с Шифови бази, са представени на Фиг. 13. В култивираните в присъствие на CuDA (в концентрация 25 $\mu\text{g/ml}$) се наблюдават оток на цитоплазмата и силно раздуване на клетъчната и ядрената мембрана. Третираните с CuDL и CuDV (в концентрация 50 $\mu\text{g/ml}$) клетки показват признаци на апоптотична смърт, клетъчните мембрани са пропускливи за PI, клетките са с намалени размери и заличени ядра (Фиг 13).

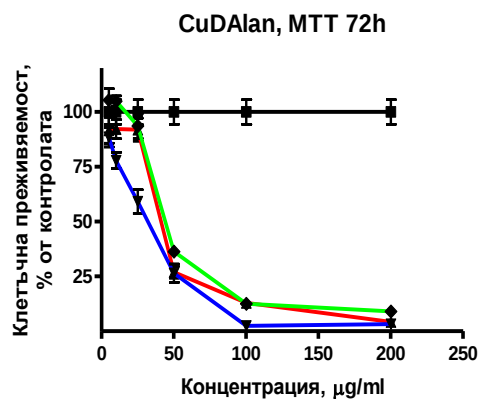


В.
Фигура 11. Влияние на комплекси на Cu(II) с Шифови бази - CuDA (А), CuDL (Б) и CuDV (В), върху преживяемостта и/или пролиферативната активност на птичите хепатомни клетки от линии LSCC-SF-Mc29 клон E7 след въздействие в продължение на 24, 48 и 72 часа. Проучването е проведено чрез MTT тест.

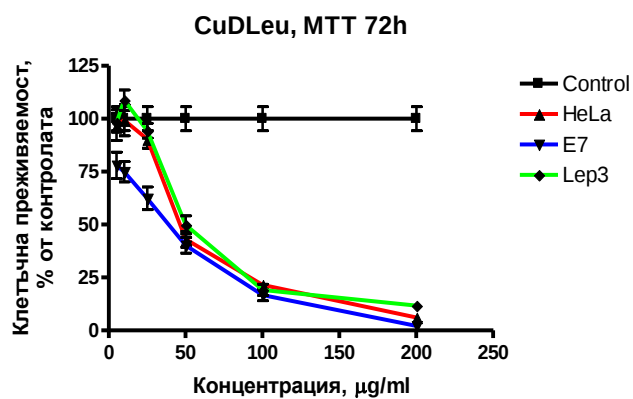
Таблица 7. Цитотоксична активност (IC_{50} и IC_{90}) на комплекси на Cu(II) с Шифови бази върху клетки от линия LSCC-SF-Mc29

Метален комплекс	LSCC-SF-Mc29 клон E7, 72 ч.					
	MTT		NR		CV	
	$\mu\text{g/ml}$	μM	$\mu\text{g/ml}$	μM	$\mu\text{g/ml}$	μM
CuDA	31.2* (83.2)**	59.0 (157.2)	39.5 (86.5)	74.6 (163.4)	26.3 (79.8)	49.7 (150.9)
CuDL	38.6 (147.4)	67.0 (255.5)	30.4 (97.4)	52.7 (168.4)	65.85 (174.6)	114.1 (306.1)
CuDV	37.0 (88.9)	61.3 (147.5)	28.8 (92.2)	48.0 (152.9)	44.4 (93.9)	73.6 (155.7)

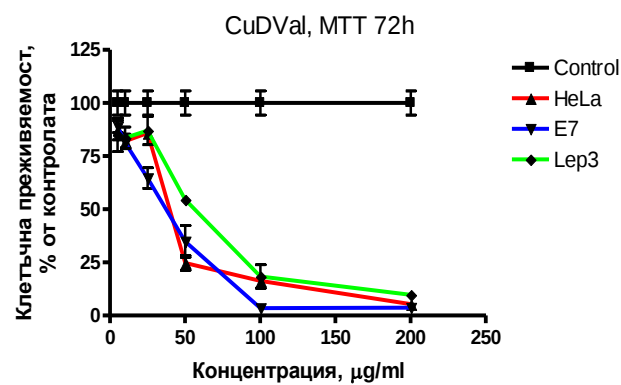
MTT = MTT тест; NR = оцветяване с неутрално червено; CV = оцветяване с кристал виолет; * IC_{50} и ** IC_{90} (в скоби) - концентрациите ($\mu\text{g/ml}$ и μM), при които процентът на живите клетки намалява с 50%, респективно с 90%, в сравнение с нетретираната контрола.



А



Б



В

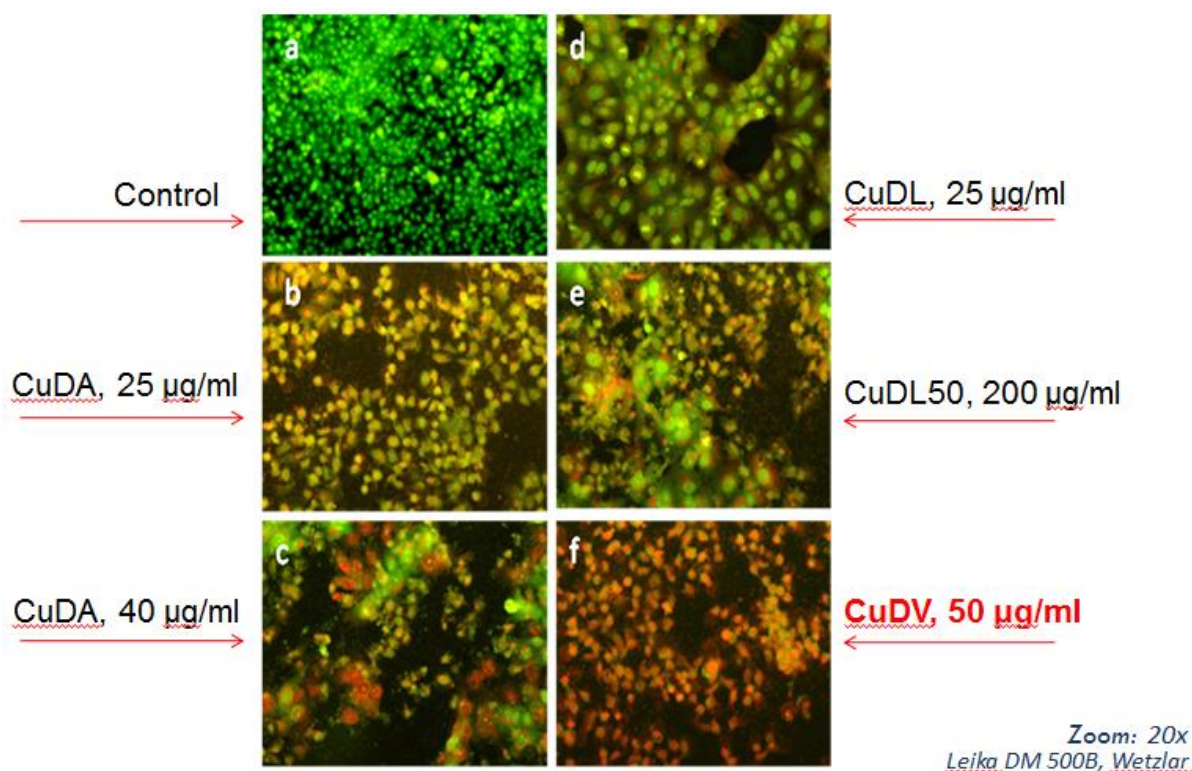
Фигура 12. Въздействие на комплекси на Cu(II) с Шифови бази – CuDA (А), CuDL (Б) и CuDV (В), върху преживяемостта и/или пролиферативната активност на човешки туморни (HeLa, LSCC-SF-Mc29 клон E7) и нетуморни (Lep-3) клетки след третирането им в продължение на 72 часа. Проучването е проведено чрез MTT тест.

Таблица 8. Йерархични редове на комплекси на Cu(II) с Шифови бази, отразяващи способността им да намаляват преживяемостта на третираните туморни и нетуморни клетки

Йерархични редове на активност на медни комплекси	
MTT, 72 ч. от началото на третирането, (μM)	
LSCC-SF(Mc29)	
CisPt > CuDA > CuDV > CuDL	
HeLa	
CisPt > CuDV > CuDA > CuDL	
Lep-3	
CisPt > CuDA > CuDL > CuDV	

CisPt = Цисплатина; Изпитваните вещества са подредени (в низходяща последователност според способността си да намаляват преживяемостта / пролиферативната активност на третираните клетки) въз основа на цитотоксична концентрация ЦК₅₀ (μM), определена чрез MTT тест след въздействие в продължение на 72 часа.

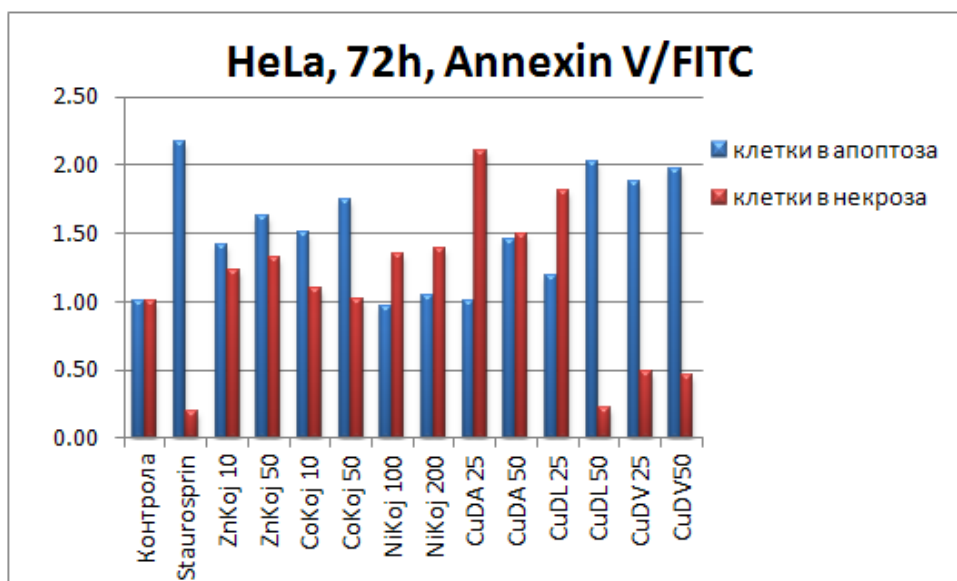
Цитотоксичният ефект на цисплатината е установен при други проучвания на нашата група (Дякова, 2019; Dinev et al., 2020) и не е обект на представения дисертационен труд. Информацията е включена тук с цел провеждане на сравнителен анализ.



Фигура 13. (a) Нетретирани клетки от линия HeLa (Контрола). Клетки от същата линия, HeLa, третирани в продължение на 72 часа с CuDA в концентрации 25 и 40 $\mu\text{g/ml}$ (b,c); 50 $\mu\text{g/ml}$ CuDL (d,e); 50 $\mu\text{g/ml}$ CuDP (f). Двойно оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодидж (AO/PI)

Микроскоп Leica DM 5000B, Leica, Microsystems, Германия, Бар = 20 μm

Идентифицирането на типа на клетъчната смърт (апоптоза, некроза), предизвикана от изпитваните комплекси на Cu(II) с Шифови бази е направено със стандартен кит (ImmunoCRUZ, САЩ) съгласно указанията на Фирмата – производител. Получените резултати са представени на Фиг. 14 и показват способността на изследваните съединения да предизвикват апоптоза и/или некроза в култивираните за 72 часа в тяхно присъствие човешки карциномни клетки от линия HeLa в сравнение с контролата, където апатозата, респективно некрозата, условно са приети за 1.



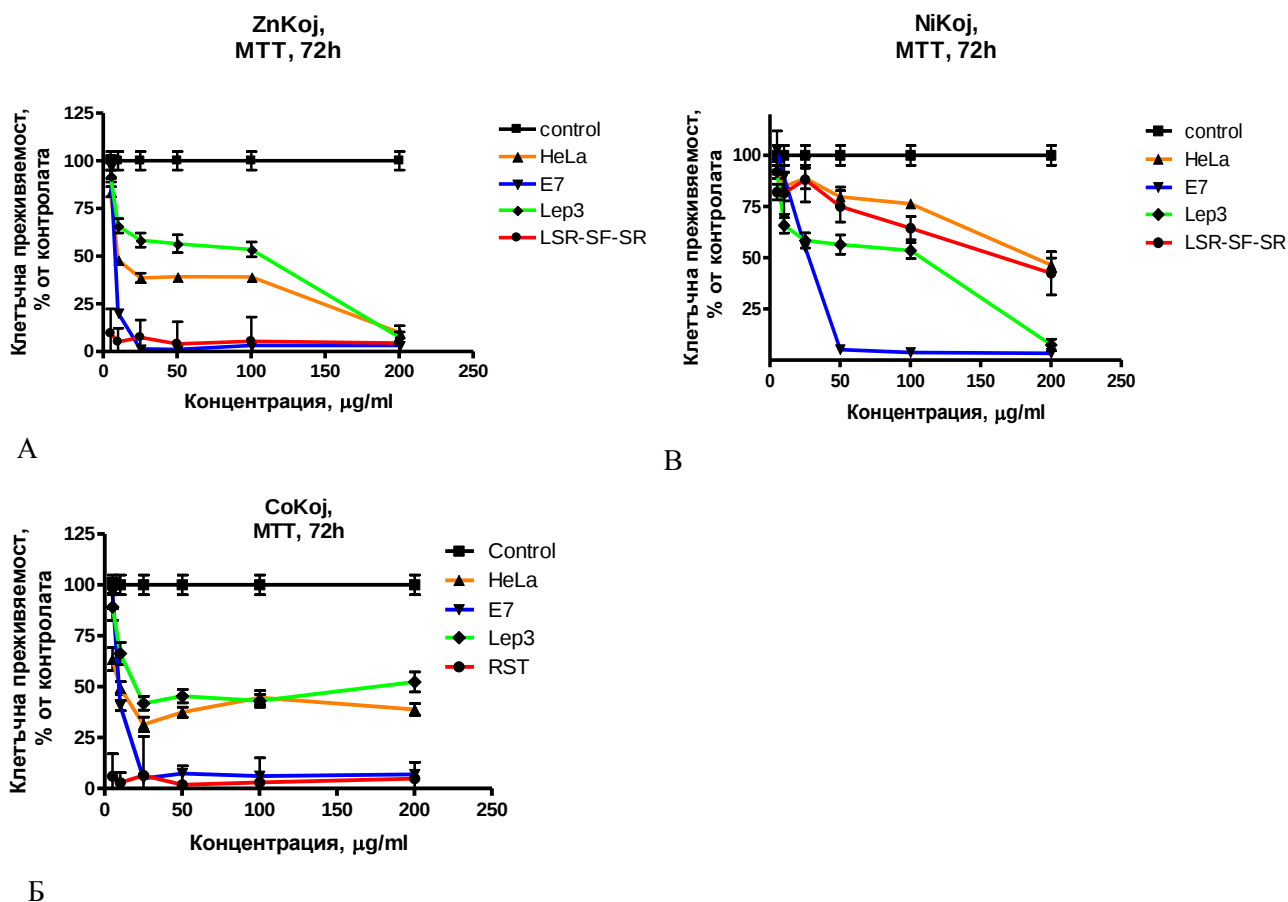
Фигура 14. Идентифициране вида на предизвиканата клетъчна смърт (апоптоза / некроза), предизвикана от изследваните комплекси на Cu(II) с Шифови бази и на Zn(II), Co(II) и Ni(II) с коджикова киселина в човешки карциномни клетки от линия HeLa. Клетките са култивирани 72 часа в присъствие на изследваните вещества, чиято концентрация е посочена след наименованието на комплекса. Типът на предизвиканата под въздействие на веществата смърт (апоптоза, некроза) е определен чрез Annexin V/FITC метод със стандартен кит (ImmunoCRUZ, САЩ). Данните от третираните проби са представени в условни единици спрямо контролата, където апоптозата, респ.некротата, са приети за единца.

А.1.2. Комплекси на Zn(II), Co(II) и Ni(II) с коджикова киселина

Изследвано е влиянието на изпитваните комплекси на Zn(II), Co(II) и Ni(II) с коджикова киселина върху преживяемостта и пролиферативната активност на птичи хератомни (LSCC-SF-Mc29 клон E7), плъши саркомни (LSR-SF-SR) и човешки карциномни (HeLa) клетки, както и на нетуморни човешки ембрионални клетки (Lер-3). Въз основа на натрупаните данни, от кривите „концентрация – отговор” ЦК₅₀ и ЦК₉₀ за всячки клетъчни линии са съставени йерархични редове. Резултатите са представени на Фиг. 15 и Табл. 9 и 10.

Най-висока цитотоксична активност при клетките от линия LSCC-SF-Mc29 клон E7 проявява комплексът ZnKoj, а при човешките карциномни клетки от линия HeLa – CoKoj. И при двете линии (LSCC-SF-Mc29 клон E7, HeLa) най-слабо проявен е цитотоксичният ефект на комплекса с Ni(II).

Измерените с помощта на трите използвани цитотоксични метода (MTT, NR, CV) експериментални данни показаха нарастваща цитотоксична активност на веществата с увеличаване на приложената върху клетките концентрация и удължаване на времето на въздействие.



Фигура 15. Въздействие на комплекси на Zn(II) (А), Co(II) (Б) и Ni(II) (В) с коджикова киселина, приложени в концентрации 5 – 200 µg/ml за 72 часа, върху преживяемостта и/или пролиферативната активност на туморни (HeLa, LSR-SF-SR, LSCC-SF-Mc29 клон E7) и нетуморни (Lep-3) клетки. Проучването е проведено чрез MTT тест.

Таблица 9. Цитотоксична активност (ЦК₅₀ и ЦК₉₀) на комплекси на Zn(II), Co(II) и Ni(II) с коджикова киселина върху клетки от линия HeLa

Метален комплекс	HeLa, 72 ч.					
	MTT		NR		CV	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM
ZnKoj	9.8* (199.4)**	18.5 (377.7)	26.3 (173.0)	49.8 (97.7)	9.8 (n.o)	18.5 (n.o)
NiKoj	186.2 (n.o)	357.1 (n.o)	162.3 (n.o)	311.2 (n.o)	185.3 (n.o)	355.5 (n.o)
CoKoj	9.0 (n.o)	15.3 (n.o)	13.9 (n.o)	23.7 (n.o)	6.5 (n.o)	11.1 (n.o)

MTT = MTT тест; NR = оцветяване с неутрално червено; CV = оцветяване с кристал виолет;
 *ЦК₅₀ и **ЦК₉₀ (в скоби) - концентрациите (µg/ml и µM), при които процентът на живите клетки намалява с 50%, респективно с 90%, в сравнение с нетретираната контрола; С н.о. (не е определена) са означени случаите, при които данните за преживяемостта на клетките не са позволили определянето на ЦК₉₀.

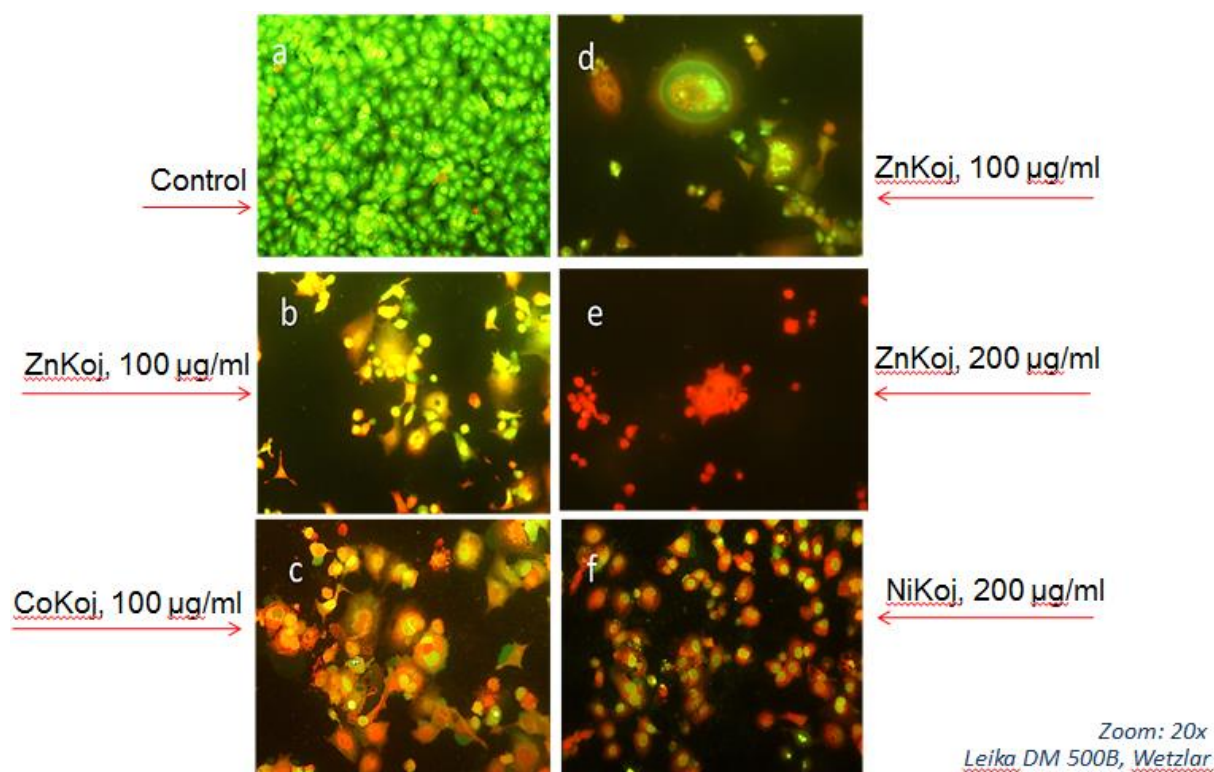
Таблица 10. Йерархични редове на комплекси на Zn(II), Co(II) и Ni(II) с коджикова киселина, отразяващи способността им да намаляват преживяемостта на третираните туморни и нетуморни клетки

Йерархични редове на активност на метални комплекси с коджикова киселина MTT, 72 ч. от началото на третирането, (μM)
LSCC-SF(Mc29)
ZnKoj > CoKoj > CisPt > NiKoj
LSR-SF-SR
CoKoj > ZnKoj > CisPt > NiKoj
HeLa
CoKoj > CisPt > ZnKoj > NiKoj
Lep-3
CoKoj > CisPt > ZnKoj > NiKoj

CisPt = Цисплатина; Изпитваните вещества са подредени (в низходяща последователност според способността си да намаляват преживяемостта / пролиферативната активност на третираните клетки) въз основа на цитотоксична концентрация ЦК₅₀ (μM), определена чрез MTT тест след въздействие в продължение на 72 часа. Цитотоксичният ефект на цисплатината е установен при други проучвания на нашата група (Дякова, 2019; Dinev et al., 2020) и не е обект на представения дисертационен труд. Информацията е включена тук с цел провеждане на сравнителен анализ.

При култивиране на човешки карциномни клетки от линия HeLa с комплекси на Zn(II), Co(II) и Ni(II) с коджикова киселина, приложени в концентрации 100-200 μg/ml за 72 часа, се установява намаляване на броя на клетките, като на места са видими само единични клетки (Фиг. 16). Те са със значително увеличени размери и изразена ядрена анизоцитоза, а някои са многоядрени. Откриват се и клетки с променена форма и звездовидни израстъци, като има участъци с наличие само на единични клетки, които са с разрушена ядрена мембрана и клетъчна мембрана с излив на цитоплазмено

съдържимо. Преобладават клетките с признаци на некроза, с изключение на третираните с ZnKoj и CoKoj в концентрация 100 $\mu\text{g/ml}$, където се наблюдават и апоптотични клетки с намалени размери, силно пикнотични ядра и апоптични пъпкувания. Способността на изпитваните метални комплекси на Zn(II), Co(II) и Ni(II) с коджикова киселина да предизвикват апоптоза и некроза е доказана и с Annexin V / FITC анализ, данните са представени на Фиг. 14.



Фигура 16. (a) Контрола от растящи в монослой клетки от клетъчна линия HeLa на 72-ия час след посяването. Клетки от линия HeLa, третираны в продължение на 72 часа със следните комплекси: (b,d,e) ZnKoj в концентрации 100 $\mu\text{g/ml}$ и 200 $\mu\text{g/ml}$; (c) CoKoj в концентрации 100 $\mu\text{g/ml}$; (f) NiKoj в концентрации 200 $\mu\text{g/ml}$ и 200 $\mu\text{g/ml}$. Оцветяването е проведено чрез двойно флуорохромиране с пропидиев йодид и акридин оранж (AO/PI)

Микроскоп Leica DM 5000B, Leica, Microsystems, Германия, Бар = 20 μm

А.2. Дългосрочни експерименти с 3D колонии от туморни клетки

Изследвано беше влиянието на изпитваните метални комплекси върху 3D колонии-образуващата способност на туморните клетки. Първите колонии от 10-12 клетки наблюдавахме в контролата от нетретирани клетки обикновено към 7-8 ден. Концентрациите, които напълно потискат образуването и растежа на 3D в полутечна среда са обобщени в Табл. 11 и 12.

Таблица 11. 3D колонии инхибиращи концентрации (КИК, $\mu\text{g/ml}$ и μM) на комплекси на Zn(II) с Шифови бази при клетки от линии MCF-7 и MDA-MB-231

Комплекс	MCF-7	MDA-MB-231
Продължителност на експерименти, дни	42	43
ZnDP	-	≥ 50 (77.2)
ZnDA	$\geq 100^*$ (191.3)**	≥ 100 (191.3)
ZnDL	≥ 100 (162.3)	≥ 50 (81.9)
ZnDV	≥ 50 (90.6)	≥ 50 (90.6)

С (-) са означени случаите, при които КИК не е определена, тъй като при нито една от изпитваните концентрации (10-200 $\mu\text{g/ml}$) на веществата не е наблюдавано пълно потискане на 3D растежа на туморните клетки; КИК е представена в $\mu\text{g/mL}^*$ и μM^{**} (в скоби).

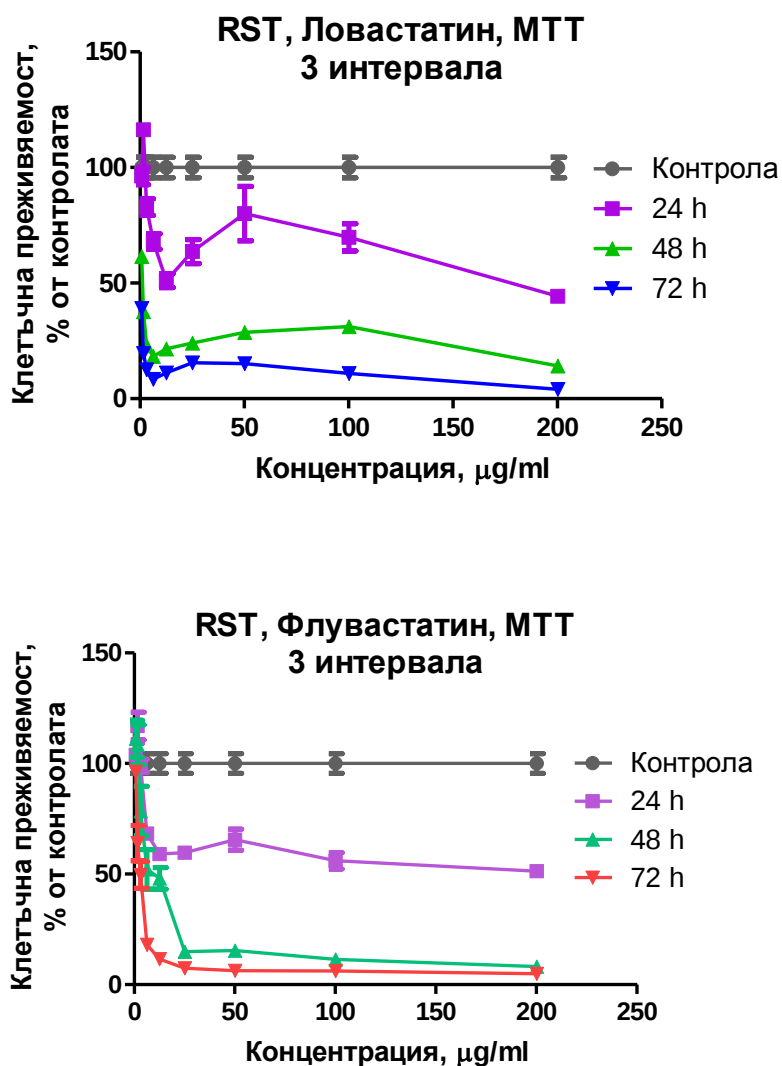
Таблица 12 . Влияние на комплекси на Zn(II), Ni(II) и Co(II) с коджикова киселина върху 3D колонии-образуващата способност на клетки от линия HeLa

Комплекс	Концентрация (µg/mL)	14 ден	28 ден	42 ден
Контрола	0	10-12 добре оформени	25-30 колонии в поле	35-40 колонии в поле
ZnKoj	10	5-10 колонии	= К	= К
	50	Отделни струпвания от клетки от 3-4 клетки, по 5-6 стр. в зр поле	Отделни малки колонии, 5-6/ поле	2-3 Средно големи
	100	Колонии липсват	Колонии липсват	по 2-3 малки колонии в поле
	200			единични по-дребни
NiKoj	10	= К	= К	= К
	50	Колонии липсват Отделни струпвания от по 3-4 клетки.	10-12 колонии в поле	Ямката е жълта, големи, добре оформени колонии
	100		Колонии липсват	Колонии липсват, единични клетки
	200			
CoKoj	10	1-2 колонии има, в поле	5-6 колонии/поле	= К
	50	Колонии липсват	Колонии липсват	3-4 колонии в цялата ямка
	100			Колонии липсват
	200	Единични колонии		

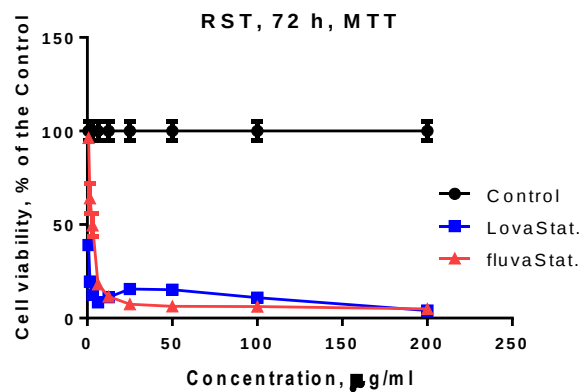
*Наличие на клетки / колонии в зрително поле и кратко описание за тях (брой в зрително поле, големина); Наличието и 3D растежът на клетките са наблюдавани в 4-6 независими полета с помощта на инвертен светлинен микроскоп (Carl Zeiss, Jena, Germany)

Б. Статини

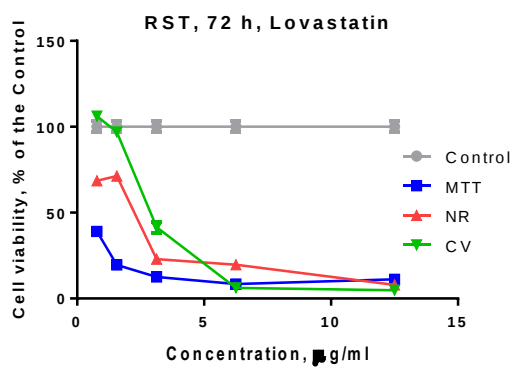
Цитотоксичният ефект на статините върху плъшите саркомни клетки беше определен с помощта на МТТ тест, метод за оцветяване с неутрално червено (NR) и багрено с кристал виолет (CV). Получените резултати са представени на Фиг. 17-18 и в Табл. 13.



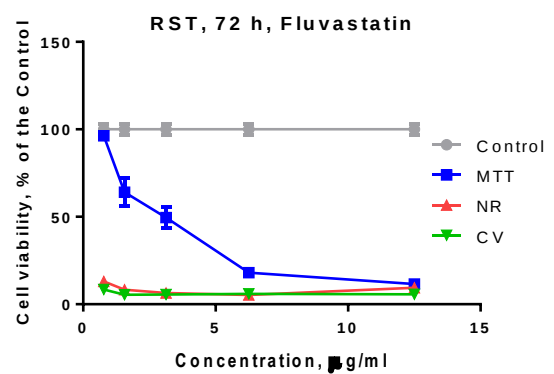
Фигура 17. Влияние на ловастатин и флувастатин върху преживяемостта и пролиферативната активност на плъши саркомни клетки от линия LSR-SF-SR. Веществата са приложени в концентрации 0.75, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 и 200 µg / ml за 24, 48 и 72 часа. Изследването е проведено чрез МТТ тест.



A



Б



В

Фигура 18. Влияние на ловастатин и флувастатин върху преживяемостта и пролиферативната активност на плъши саркомни клетки от линия LSR-SF-SR. Веществата са приложени зая 72 часа в концентрации 0.75 - 200 µg / ml (A) и 1.56 - 12.5 µg / ml (Б, В). Изследването е проведено чрез MTT тест (A) и чрез MTT тест (MTT), метод за оцветяване с неутрално червено (NR) и багреен с кристал виолет (CV) (Б, В).

Таблица 13. Цитотоксична активност ($ЦК_{50}$ и $ЦК_{90}$) на статини (ловастатин, флувастатин) върху плъши саркомни клетки от линия LSR-SF-SR

Вещество	Интервал на въздействие, часове	MTT	NR	CV
Ловастатин	24	178.1 -	- -	- -
	48	1.16 -	- -	- -
	72	- (185.8)	2.25 (11.52)	2.89 (5.91)
Флувастатин	24	- -	- -	- -
	48	9.51 (143.6)	- -	- -
	72	3.01 (17.24)	- (1.43)	- -

MTT = MTT тест; NR = оцветяване с неутрално червено; CV = оцветяване с кристал виолет; * $ЦК_{50}$ и ** $ЦК_{90}$ (в скоби) - концентрациите ($\mu\text{g/ml}$), при които процентът на живите клетки намалява с 50%, респективно с 90%, в сравнение с нетретираната контрола; С (-) са означени случаите, при които данните за преживяемостта на клетките не са позволили определянето на $ЦК_{50}$ / $ЦК_{90}$.

Цитопатологични изменения в третираните клетки

Способността на ловастатина и флувастатина да предизвикват цитопатологични изменения в третираните клетки беше изследвана чрез оцветяване с хематоксилин и еозин, както и чрез двойно оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид. Типът на предизвиканата от тях смърт беше определен чрез Annexin V анализ. Плъшите саркомни клетки бяха култивирани в продължение на 20 часа в присъствие на ловастатин и флувастатин, приложени в концентрации 0.75 до 1.56 $\mu\text{g/mL}$ (Фиг. 19).

Оцветяване с хематоксилин и еозин

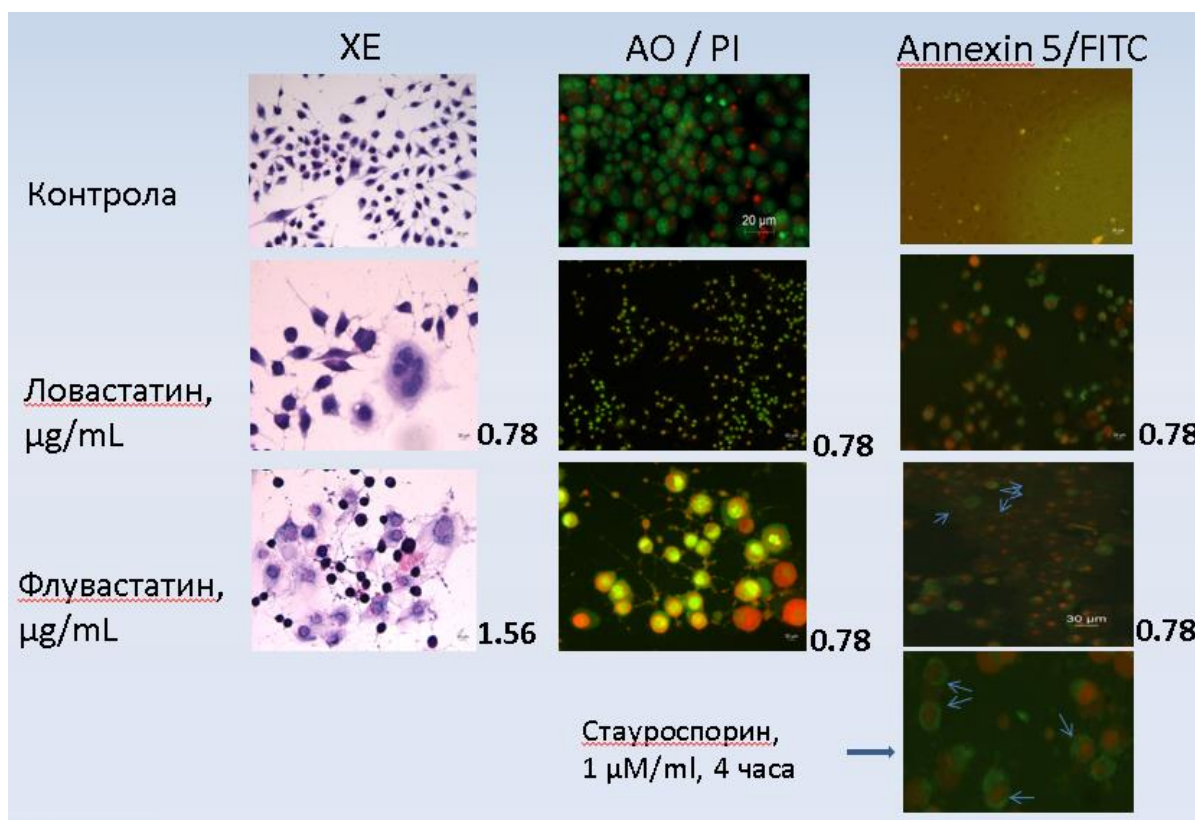
Представените на Фиг. 19 изображения показват, че нетретираните плъши саркомни клетки в контролата останаха еднородни по форма и размери, преобладаващо кръгли, но се наблюдаваше и наличие и на вретеновидно източени клетки. Третираните с Ловастатин (в концентрации от 0.75 и 1.56 $\mu\text{g/mL}$ за 20 часа) клетки бяха представени от полиморфна популация, съдържаща около 70 % витални клетки, клетки с оточна цитоплазма и гигантски многоядрени клетки. В същото време, третираните със същите концентрации Флувастатин клетки изглеждаха окръглени, с пикнотични ядра и оформени групи от клетки с оточна цитоплазма. Не се забелязваше наличие на митотична активност. Отделни клетки образуваха апоптотични тела (Фиг. 19, колона ХЕ).

Двойно оцветяване с акридин оранжев (АО) и пропидиев йодид (PI)

Нетретираните плъши саркомни клетки останаха мономорфни, с умерена митотична активност. Клетките, третираните в продължение на 20 часа с 0.78 $\mu\text{g/mL}$ Ловастатин бяха представени от около 25 % клетки с нарушена цялост на клетъчната мембрана, преобладаващо мономорфни и витални, с добре маркирана от пропидиевия йодид цитоплазма и запазени интактни ядра, с наличие в клетъчната популация на единични гигантски многоядрени клетки. При същите условия, на полученото изображение на клетки третираните с Флувастатин преобладаваха витални клетки с фрагментиран хроматин и ядрено-цитоплазмен индекс значително изместен в полза на ядрата; изразена митотична активност и единични невителни клетките и клетки в напреднала апоптоза с формирани апоптотични телца (Фиг. 19, колона АО/PI).

Annexin V анализ

Отрицателната контрола в присъствие на Анексин V запази виталността на клетките, които останаха еднородни, с обичайна морфология и без наличие на флуоресцентен сигнал за реакция. В положителната контрола бе стимулирана контролирана апоптоза посредством третиране със Стауроспорин, приложен в концентрация от 1 $\mu\text{g/mL}$ за период от 4 ч., съгласно стандартна методика и инструкцията на фирмата - производител. Клетките бяха третирани с Ловастатин и Флувастатин в концентрация от 0.78 $\mu\text{g/mL}$, в продължение на 20 ч. Образното изследване на 20-ия час показва наличие на витални клетки, маркирани с Анексин V и единични клетки в напреднала апоптоза при културите, третирани с Ловастатин и мембранна локализация на Анексин V върху клетките, третирани с Флувастатин (Фиг. 19, колона Annexin V)



Фигура 19. Цитопатологични промени, предизвикани под въздействие на Ловастатин и Флувастатин, приложени за 20 часа в концентрации 0.78 и 1.56 $\mu\text{g/mL}$. Образни визуализации снети чрез оцветяване на експерименталните образци по методиката, по реда на колоните, като следва: 1) оцветяване с хематоксилин и еозин; 2) двойно оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид; 3) Анексин V анализ. В изследването е използвана контрола от нетретирани клетки. При проучването с Annexin V е включена и положителна контрола – стауроспорин (в концентрация ($\mu\text{g/mL}$) за 4 часа), съгласно инструкциите на Фирмата производител.

Микроскоп Leica DM 5000B, Leica, Microsystems, Германия, Бар = 20 μm

Дългосрочни експерименти с 3D колонии от саркомни клетки

Провеждането на 3D колонии-формирания метод показва, че приложени в концентрации $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ (Флувастатин) и $\geq 200 \mu\text{g/ml}$ (Ловастатин) изпитваните от нас статини напълно потискат 3D растежа на плъшите саркомни клетки (Табл. 14)

Таблица 14. Колонии образуващата способност на клетките от трансплантируем сарком у плъх LSR-SF-SR (RST), третирани с Ловастатин и Флувастатин.

Метален комплекс	Концентрация ЦК50 ($\mu\text{g/ml}$) 72 ч., MTT	Концентрация, ($\mu\text{g/ml}$) 14-ти ден	Наличие на колонии
Ловастатин	под 0.76	200	Пълно потискане на 3D растежа
Флувастатин	3.08	100 - 200	Пълно потискане на 3D растежа

В. Сравнителни данни за цитотоксичната активност на изпитваните метални комплекси с Шифови бази и коджикова киселина и цисплатината

Сравнителни данни за цитотоксичната активност на изпитваният от нас комплекси на Zn(II), Cu(II), Co(II) и Ni(II) с Шифови бази или коджикова киселина и антитуморния препарат цисплатина са представени в Табл. 15.

Таблица 15. Йерархични редове на комплекси на Zn(II), Cu(II), Co(II) и Ni(II) с Шифови бази или коджикова киселина и на антитуморния препарат цисплатина, отразяващи способността им да намаляват преживяемостта на третираните туморни и нетуморни клетки

Йерархични редове на активност на веществата
MTT, 72 ч. от началото на третирането, (μM)
LSCC-SF(Mc29)
ZnKoj>CoKoj>ZnDV>CisPt>CuDA>CuDV>ZnDL>CuDL>ZnDA>NiKoj>ZnDPh
LSR-SF-SR
CoKoj>ZnKoj>CisPt>ZnDV>ZnDL>ZnDPh>ZnDA>NiKoj
HeLa
CoKoj>CisPt>ZnKoj>ZnDV>CuDV>ZnDL>CuDA>CuDL>ZnDA>ZnPh>NiKoj
Lep-3
CoKoj>CisPt>ZnDV>ZnDL>CuDA>CuDL>CuDV>ZnDPh>ZnDA>ZnKoj

CisPt = Цисплатина; Изпитваните вещества са подредени (в низходяща последователност според способността си да намаляват преживяемостта / пролиферативната активност на третираните клетки) въз основа на цитотоксични концентрации ЦК₅₀ (μM), определена чрез MTT тест след въздействие в продължение на 72 часа. Цитотоксичният ефект на цисплатината е установен при други проучвания на нашата група (Дякова, 2019; Dinev et al., 2020) и не е обект на представения дисертационен труд. Информацията е включена тук с цел провеждане на сравнителен анализ.

Г. Диметилсулфоксид

Добавен към културалната среда в концентрации аналогични на тези в разтворите на изпитваните съединения, диметилсулфоксидът не доведе до забележими промени в преживяемостта на култивираните в негово присъствие клетки. Преживяемостта на всички изпитвани от нас в присъствие на DMSO клетъчни линии е 95-100%, като наблюдаваните разлики не са статистически достоверни в сравнение с нетретираните контроли ($p > 0.05$). Този факт съвсем не е изненадващ, тъй като в изходните разтвори (в които концентрацията на изследваните вещества е 1 mg/ml), съдържанието на DMSO е 2%, а в работните концентрации (където концентрацията на изпитваното вещество е 5 – 200 $\mu\text{g/ml}$) относителният дял на диметилсулфоксида прогресивно намалява (съответно от 0.01 до 0.4%).

5. ОБСЪЖДАНЕ

Комплексните съединения на есенциални метали с различни лиганди, включително Шифови бази и коджикова киселина, демонстрират съществен потенциал за съчетаване на основните задължителни характеристики, на които следва да отговарят антитуморните лекарствени агенти (висока цитотоксичност върху туморните клатки съчетана с добра биосъвместимост и преодоляване на туморните механизми за избягване на клетъчната смърт и лекарствена устойчивост - представени в частта «Обзор»). Голямо разнообразие от комплексни съединения на Шифови бази се изследват в медицинската химия и експерименталната фармакология във връзка с тяхната способност за преодоляване на лекарствената устойчивост при ракови клетки и микроорганизми. Популярността на тези съединения се дължи на химичната им структура, характеризираща се с висока функционалност (повече от една реактивоспособни функционални групи), която предоставя възможност за разнообразни химични модификации. Това позволява на техните производни съединения да атакуват едновременно няколко молекулни мишени в клетката.

Есенциалните метали и техни съединения са интегрална част от регулацията на ключови физиологични процеси и са модификатори на биологичния отговор. Нарушените им бионаличност и равновесие при бозайниците водят до предразположеност към възникване и развитие на злокачествени заболявания. Тяхната естествена биологична роля, както и умелото им «вграждане» в дизайна на по-сложни химични съединения, особено такива с аминокиселини, е предпоставка за по-слаба токсичност и повишен клетъчен афинитет.

В посока на постигането на биологична съвместимост, още един кандидат за задълбочени изследвания като потенициален противотуморен агент е коджиковата киселина. Със своя естествен произход тя притежава много добра биологична поносимост, която се очаква да се повиши в съединенията ѝ с есенциални метали. Нарастващ обем от обещаващи изследвания върху съединения на коджиковата киселина дават основание да се разширят изследванията върху антитуморните свойства на това биосъвместимо природно съединение.

От друга страна, химични съединения, вече утвърдени в терапевтичната практика за лечение на заболявания, различни от рака, демонстрират обещаващи перспективи за пренасочване (“repurposing drugs”) като химиотерапевтици в онкологията. Такава е и групата на статините, приета като стандарт при лечение на хиперхолестеролемия, но с все още частично проучени антитуморни свойства.

Наши предходни проучвания върху поставените проблеми, подкрепени от опита на редица изследователи, ни дадоха основание да очакваме, че комплекси на Zn(II) и Cu(II) с производни на 2,6-диформил крезол (Diald) притежават антитуморни свойства със сравнимо, а в някои случаи дори превишаващо действие, в условия *in vitro*, на използваните като стандарти в клиничната онкология лекарствени препарати. От друга страна, налични са ограничени данни в научната литература, че някои метални комплекси на коджиковата киселина, изследвани до момента върху неголям брой клетъчни линии, също проявяват цитотоксични свойства. При подготовката на представения дисертационен труд си поставихме за цел да задълбочим изследванията на изброените съединения и разширим обхвата на провежданите до момента проучвания - както нашите предходни, така и докладваните в научната литература (по отношение на съединенията на коджиковата киселина), като проследим въздействието на комплексите върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия човешки и животински ракови клетки при клетъчни линии, върху които те не са прилагани.

Влиянието на десет новосинтезирани комплекса на Zn(II), Cu(II), Co(II) и Ni(II) с Шифови бази и с коджикова киселина, както и на два статина (ловастатин и флувастатин) върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия човешки и животински туморни и нетуморни клетки е изследвано за първи път в представения дисертационен труд. Изпитваните химични агенти групирахме според тяхната структура и състав в четири групи, както следва:

- Комплекси на Zn(II) с Шифови бази;
- Комплекси на Cu(II) с Шифови бази;
- Комплекси на Zn(II), Co(II) и Ni(II) с коджикова киселина.
- Ловастатин и Флувастатин – представители на групата на статините, отдавна утвърдени в клиничната практика лекарствени продукти за лечение на хиперлипидемия. Статините (както и нестероидните противовъзпалителни средства и дисулфирамът) се използват широко като т.нар. „*repurposing*“ агенти, изследвани за пренасочване към нуждите на клиничната онкология.

Антитуморният потенциал на статините е привлекателен поне по две причини:

Първо, съобщено е, че тези лекарства притежават противоракови свойства срещу голямо разнообразие от моделни системи *in vitro* и *in vivo* [195, 196, 197, 198], включително клетъчни култури, получени от някои от най-агресивните, летални и

социално значими злокачествени новообразувания у човека, за някои от които в момента има ограничен брой терапевтични възможности, като недребноклетъчен рак на белия дроб [199], тройно негативен рак на гърдата [200, 201], рак на панкреаса [197, 202], остеосарком [203] и мултиформен глиобластом [198, 204]. Данните показват, че комбинацията от симвастатин и меклофенаминова киселина може да бъде ефективна стратегия за лечение на резистентен на кастрация рак на простатата [205]

Второ, високите разходи и продължителността на разработването и предклиничните и клиничните изпитвания на нови лекарства, както и ниският процент на успех, мотивират пренасочването (drug repurposing) на съществуващи добре познати и вече характеризирани (фармакокинетика, фармакодинамика, профил на безопасност) лекарства, одобрени и използвани при други индикации, за ново приложение в онкологията [206, 207].

Избор на химичните агенти

Изборът на изследваните съединения беше извършен въз основа на няколко техни характеристики, които дават основание от тях да се очаква наличие на антитуморни свойства. От една страна, като есенциални елементи, жизнено необходими за нормалното функциониране на човека и животните, металите влизащи в състава на съединенията се предполага, че тъй като те са модификатори на биологичния отговор биха могли да допринесат за по-слаба токсичност на въздействието на терапията на туморните заболявания спрямо здравите тъкани (напр. в сравнение с утвърдената при терапията на рака платина). От друга страна, наличието в химичната структура на изследваните вещества на Шифови бази, които проявяват висока химична функционалност и биологична толерантност, които в случая на това изследване правят възможно участието на аминокиселините аланин, валин, левцин и фенилаланин в съединението. По този начин Шифовите бази могат да реагират едновременно с няколко молекулни мишени в клетката. Тези свойства на изследваните вещества биха могли да повишат техния терапевтичен ефект и да понижат възможността за възникване и селектиране на устойчиви към действието им клетки. За металните комплекси на Шифовите бази е известно, че притежават антитуморни, имуномодулиращи, антивирусни, антимикробни свойства и тези активности често са по-силно изразени в сравнение със самостоятелно приложения лиганд.

В предишни проучвания установихме, че комплекси на Zn(II)/Ag(I) и Zn(II)/Au(I) с Шифовите бази Salen, Salampy, Saldmen и производни на Dald

значително намаляват преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия птичи, плъши и човешки ракови клетки, включително такива, характеризиращи се с множествена лекарствена устойчивост (Абудалех, 2014, Живкова, 2018, Zhivkova et al., 2019).

Избор на клетъчни линии

Като експериментални модели използвахме клетъчни линии, получени от двете най-разпространени злокачествени новообразувания при жените – на млечната жлеза (MDA-MB-231, MCF-7) и на шийката на матката (HeLa); две оригинални клетъчни линии, получени от трансплантируеми тумори в кокошка и плъх, предизвикани с птичи левкозни и саркомни ретровируси: LSCC-SF-Mc29, получена от трансплантируем хепатом у пиле, предизвикан с миелоцитоматозния вирус Mc29 и LSR-SF-SR (RST), създадена от трансплантируем сарком у плъх, индуциран с *Rous sarcoma virus* щам *Schmidt-Ruppin* (SR-RSV). Клетъчните линии MDA-MB-231 и MCF-7 са получени от два различни подтипа карциноми на млечната жлеза – тройнонегативен (MDA-MB-231) и луминален тип А (MCF-7) и се различават по свои основни и съществени биологични характеристики (Табл. 3)

Спряхме се на тези клетъчни линии като експериментални модели, от една страна поради огромния социално-здравен проблем, който представляват онкологичните заболявания, представени чрез третираните клетъчни линии и наложителността от намиране на ефективни терапевтични решения.

Клетъчна линия HeLa (Gey et al., 1952) се използва широко като моделна система за провеждане на изследвания за цитотоксичност, както и за други значими проучвания като установяване на връзката на рака на шийката на матката с човешкия папиломаен вирус.

Линиите MDA-MB-231 и MCF-7 са карциноми на млечната жлеза, но поради съществените си различия, предопределени от различният им подтип (тройнонегативен -MDA-MB-231; луминален тип А - MCF-7) предлагат възможност за по-точно насочване към възможни хипотези при интерпретацията на експерименталните резултати, по отношение на очакваните характеристики, когато бъдат използвани паралелно при тестване на химични агенти.

Линия LSR-SF-SR (RST) се характеризира с експресията на онкогена *v-src* - първият идентифициран вирусен онкоген. Неговите клетъчни аналози са мембранно-свързани нерецепторни тирозинкинази, които са с ключово участие в редица важни

биологични процеси, сред които и пролиферацията на клетките. Разпознати са като обещаваща мишена за насочена антитуморна терапия.

Клетките на линия LSCC-SF-Mc29 и получения от нея клон E7 експресират онкогена *v-myc*. Неговите клетъчни аналози – протоонкогените *c-myc*, *N-myc* и *L-myc*, са открити при широк кръг животински организми (*c-myc*), както и при човека (и трите протоонкогена). Те са ядрени фосфопротеини – транскрипционни фактори, които играят важна роля в белтъчния синтез, енергийния метаболизъм и епигенетичния контрол (посредством повлияване на микро РНК молекулите) на раковите клетки. Нарушенията в експресията и функцията на клетъчните аналози на *v-src* и *v-myc* гените участват в патогенезата на >80% от злокачествените заболявания при човека.

Тъй като изследването изисква да бъде направена сравнителна оценка на въздействието на изпитваните вещества върху нетуморни клетки, включихме в осъществяването на някои експерименти и клетъчна линия от нетуморни ембрионални човешки фибробластоподобни клетки (линия Lер-3).

Събраните експериментални данни дадоха възможност да обобщим следните по-съществени заключения:

Изпитваните новосинтезирани съединения понижават в различна степен преживяемостта и / или пролиферативната активност на използваните като експериментални модели туморни клетки, предизвиквайки в тях характерни цитопатологични изменения. Наблюдаваният ефект е време- и концентрация- зависим.

Експерименталните данни получавахме като провеждахме едновременно измерванията чрез три различни метода, като спазвахме равни експериментални условия. Използвахме методите МТТ тест (МТТ), метод за включване на неутрално червено (NR) и/или оцветяване с кристал виолет (CV). Различните мишени при трите метода – редуциране на жълто оцветения thiazolyl blue tetrazolium bromide от митохондриалния ензим сукцинат дехидрогеназа до оцветен в лилаво формаган при МТТ; оцветяване на киселите органели (лизозоми, вероятно и ендоплазматичен ретикулум) на клетката от алкалното багрило неутрално червено (NR) и прикрепянето към ДНК на багрилото кристал виолет (CV), дават база за добра сравнителна оценка на интересувашите ни клетъчни характеристики. Цитопатологичните изменения визуализирахме чрез оцветяване с хематоксилин и еозин, акридин оранж и пропидиев йодид както и с имуноцитохимичното доказване на експресията на маркера за клетъчна пролиферация Ki-63. Получените резултати се потвърдиха от всички използвани от нас изследователски техники. При култивираните в продължение на 24 часа в

присъствие на 175 µg/ml ZnDA клетки от тройно негативен рак на гърдата у човек беше намерено известно „разминаването“ между резултатите, получени чрез МТТ тест (50% смъртност) и Annexin V/ FITC (~ 37% смъртност: чрез апоптоза – 31.3% и чрез некроза – 6.21%) анализ резултати от една страна и данните от кометното изследване при неутрално рН от друга (липса на комети, т.е. на двойноверижни скъсвания в ДНК молекулите на третираните клетки). Според нас, обяснението на тази находка може да се търси в различни фактори, някои от които са посочени по-долу:

- Използваните методи – МТТ тест, Annexin V/FITC, Кометно изследване, имат различни клетъчни (молекули, органели) мишени и механизми на действие;
- Проведеният от нас вариант на Кометно изследване (при неутрално рН) визуализира само двойноверижни, но не и еднорежни скъсвания в ДНК молекулите (последното става при алкалния вариант на кометното изследване).

Краткосрочни тестове с 2D монослойни култури и дългосрочни експерименти с 3D колонии от туморни клетки

Интерес представлява и съпоставянето на резултатите, получени при изпълнение на краткосрочни и дългосрочни експерименти, съответно с класически монослойни (2D) култури и триизмерно (3D) растящи колонии от туморни клетки в полутечна среда.

Краткосрочните експерименти (най-често 24-72 часа) отразяват бързия цитотоксичен ефект на веществата – това е важна тяхна характеристика, тъй като е добре известно, че раковите клетки трябва да бъдат максимално бързо отстранени (чрез хирургична интервенция) от организма и/или унищожени чрез лекарствено въздействие или лъчетерапия, за да се забави / елиминира прогресията на тумора, да се намали риска от поява на близки и далечни метастази, както и от селектирането на устойчиви към действието на терапевтичните средства клетки.

Дългосрочните експерименти (които в нашия случай продължиха до над 40 дена) отразяват устойчивостта на цитотоксичния ефект на веществата, неговата необратимост. Предимствата на този вид експерименти са свързани с:

- При изпълнението им се разчита на естествената способност на злокачествено трансформирани клетки да растат триизмерно в полутечна среда, без да имат необходимост от подложка. Липсата на намеса при тази експериментална постановка (например не се използват скафолди и други специални пособия, улесняващи 3D растежа на клетките) по наше мнение дава максимално достоверна

информация за поведението на туморните клетки и повлияването им от изпитваните вещества;

- 3D клетъчните култури в по-висока степен отразяват биологията на туморните и са предпочитани моделни системи, включително в областта на експерименталната онкофармакология. Стандартните монослойни (2D) култури нерядко проявяват завишена чувствителност към цитотоксичния ефект на изпитваните съединения.

При отчитането на получените чрез 3D колонии-образуващия метод резултати се стремяхме да установим концентрацията (Колонии-инхибиращата концентрация – КИК), която напълно възпрепятства 3D растежа на туморните клетки. Намаляване на броя на колонииите, както и на размера им, беше установено при различни по-ниски от КИК концентрации, което безспорно е проява на цитотоксичния ефект на изпитваните съединения. Не бива да забравяме обаче, че появата дори на единична колония в ямката е доказателство за оцеляване на отделни клетки, които в реални условия *in vivo* могат да доведат до рецидиви или метастази и за застрашат живота на пациента.

Съвсем очаквано, стойностите на КИК са по-високи от тези на CK_{50} и CK_{90} , които отразяват намаляване на броя на живите клетки спрямо контролата с 50%, съответно с 90%.

Наблюдавана беше добра съпоставимост между резултатите, получени с двата вида експерименти – краткосрочни и дългосрочни., което е добър атестат за цитотоксичната активност на изпитваните от нас вещества.

Клетъчно – специфичен отговор

Използваните клетъчни модели показаха клетъчно-специфичен отговор. Отделните клетъчни линии се повлияха в различната степен от изпитваните вещества. Това най-вероятно се дължи на различния произход (от човек, плъх, кокошка) и характеристики (туморни/нетуморни, карциномни/саркомни) на клетъчните линии, както и на техните генетични / епигенетични, имунологични, биохимични и молекулярнобиологични особености. От своя страна хетерогенността на туморните клетки, предопределя различна възприемчивост към цитотоксичното въздействие на изпитваните вещества, най-вече поради нееднородността на туморните системи. Само за илюстрация, птичите хепатомни клетки от линия LSCC-SF-Mc29 клон E7 проявяват най-висока чувствителност към комплекса на $Zn(II)$ с коджикова киселина ($ZnKoj$), докато плъшите саркомни клетки (LSR-SF-SR), човешките карциномни клетки от рак на шийката на матката (HeLa) и нетуморните човешки фибробластоподобни клетки (Lep-3) се повлияват най-силно от $CoCoj$.

Клетките от линия Lер-3 проявяват висока чувствителност към тестваните съединения, обяснение за която може да бъде различието по отношение чувствителността към апоптоза спрямо тази на раковите клетки, която при вторите е силно занижена, за разлика от нетуморните клетки.

Заслужава да се отбележи фактът, че комплексите на Co(II), а при птичите хепатомни клетки и тези на Zn(II), с коджикова киселина превъзхождат действието на утвърдения в клиничната практика антитуморен препарат цисплатина. В същото време, тези съединения (ZnKoj и CoKoj) проявяват по-висока цитотоксична активност по отношение на човешките карциномни клетки (линия HeLa) в сравнение с нетуморните ембрионални фибробласти (линия Lер-3).

Сред изпитваните метални комплекси с Шифови бази най-висока цитотоксична активност проявява ZnDV, чийто лиганд е получен с участието на α -валин. Това се вижда най-добре в йерархични редове в Табл. 15, които показват следните закономерности: Сред комплексите на Zn(II) с Шифови бази с най-висока цитотоксична активност при клетките от линии MCF-7, MDA-MB-231, HeLa, LSR-SF-SR и LSCC-SF-Mc29 се отличава комплексът ZnDV. Комплексите на Cu(II) са по-слабо ефективни в сравнение със съответните цинкови комплекси със същите лиганди. Изследваните от нас металните комплекси на Zn(II) и Cu(II) с Шифови бази са по-слабо ефективни от цисплатината – единственото изключение е ZnDV при птичите хепатомни клетки. По-слабо ефективни са и в сравнение с комплексите на Zn(II)/Ag(I) и Zn(II)/Au(I) с други шифови бази (Salen, Salampy, Salsmen и др.), изпитвани при предишни наши проучвания (Абудаллах, 2014; Живкова, 2018).

Изясняването на механизма на потенциално антитуморно действие на съединенията и определянето на клетъчните молекулните мишени, към които проявяват афинитет, са предмет на следващи проучвания. Като възможни механизми, обуславящи антитуморно действие на металните комплекси могат да бъдат потискане на активността на хормони, ензими (топоизомеразы), растежни фактори, имунен отговор (Ancuceanu, Isidor, 2004, Alexandrova, Beykov, 2017), скъсвания в ДНК молекулите или др.

Едновременно наличие на есенциален метал и Шифова база (получена с участието на аминокиселина) или коджикова киселина, синтезирани от румънските ни партньори и изследвани от нас, придава специфични и уникални характеристики на тези съединения. Шифовата база / коджикова киселина изпълняват много добре функцията на активни носители на различни по вид и действие химични групи. Металите Zn(II), Cu(II), Co(II) и Ni(II) допринасят за по-добрата биосъвместимост, а в

допълнение, „свързаните“ аминокиселини аланин, фенилаланин, левцин и валин, се очаква да имат роля на ефективни „водещи“ групи, които улесняват асимилирането на комплексите поради своята естествената биологична природа. Продължаването на проучванията върху тях би допринесло за задълбочаването на познанията за различните клетъчни механизми и мишени, чрез които тези съединения действат, както и за значението на комбинирането в една молекула на три различни подхода на действие чрез свойствата на есенциални метали, аминокиселини и високо функционалните и биологично толерантни Шифови бази и коджикова киселина.

Статини

Противораковите свойства на статините са докладвани в началото на 1990-те години. Антипролиферативните и проапоптотичните им ефекти са документирани в широк спектър от туморни клетъчни линии и животински модели [195, 196].

Антитуморната активност на статините се свързва с различни механизми на действие, някои от които са изброени по-долу:

- F - FPP и GGPP (странични продукти от биохимичния път на мевалоната) са основни субстрати за посттранслационна модификация на GTPази, които участват в регулирането на важни биологични процеси във всички еукариотни клетки и са от значение за пролиферацията, миграцията и оцеляването на клетките [208, 209].
- Установено е, че статините синхронизират туморни клетки чрез блокиране на прехода G1-S в клетъчния цикъл, като по този начин повишават чувствителността им към лечението – съобщено е, че клетките, разположени в края на G1 и G2-M фазите на клетъчния цикъл, са най-податливи на индуцирана от йонизиращо лъчение клетъчна смърт, докато клетките, разположени в S фазата, са най-устойчиви [195, 210].
- Доказано е, че статините (например ловастатин) влияят върху така наречения Bcl-2 реостат [211], намалявайки експресията на антиапоптотичния белтък Bcl-2 и увеличавайки експресията на проапоптотичния белтък Bax [195, 197, 200].
- Статините проявяват антиангиогенни свойства, като потискат изявата на проангиогенни фактори, като съдовия ендотелен растежен фактор (VEGF), инхибират пролиферацията на ендотелните клетки и адхезията към извънклетъчния матрикс чрез въздействие върху междуклетъчните адхезионни молекули [196].
- HMG-CoA редуктазните инхибитори повлияват клетъчните сигнални пътища, свързани с инвазивните и метастатични свойства на раковите клетки [195, 197, 212]. Например, съобщено е, че ловастатин намалява експресията на CYR61 (богат на цистеин ангиогенен индуктор 6), което води до потискане на остеосаркомната клетъчна

инвазия и променена експресия на белтъци, участващи в епително - мезенхимния преход [213]. Документирано е, че симвастатин намалява експресията на матриксната металопротеиназа - 2 (MMP-2) [200].

- Изследванията показват, че статините могат да взаимодействат адитивно или синергично с някои химиотерапевтични средства като 5-флуороурацил, нитрозоурея, цисплатина, доксорубицин и др. [195]. Клинично проучване във Фаза II съобщава, че химиотерапията със симвастатин в комбинация с иринотекан / 5-флуороурацил / левковорин (режим FOLFIRI) е ефективна и осъществима, без добавъчни странични ефекти, при пациенти с метастатичен карцином на дебелото и правото черво [214].

- Установени са химиосенсибилизиращите [215, 216] и радиосенсибилизиращи [217] свойства на статините.

- Инхибирането на мевалонатния път влияе върху епигенетичната регулация в раковите клетки [218].

Докато антитуморната активност на статините е широко докладвана в предклиничните проучвания, данните за тяхната противоракова ефикасност при хората са противоречиви [195, 196, 219, 220]. Наскоро публикуваните резултати от мета-анализ на рандомизирани контролирани проучвания не подкрепят клиничните ползи от статините, добавени към системната противоракова терапия при пациенти със солидни тумори [221].

Три са предизвикателствата, които предотвратяват успешното клинично приложение на статини в терапията на раковите заболявания: 1) Тези лекарства проявяват своите противотуморни свойства в относително високи дози (дори 500 пъти по-високи от тези, използвани за лечение на хиперхолестеролемия), които могат да предизвикат сериозни странични ефекти, включително миопатия и рабдомиолиза [222]; 2) Не е възможно да се постигне толкова висока концентрация на статини (при перорален прием) в кръвообращението поради техните фармакокинетични свойства: кратък полуживот на елиминиране (най-често 3 часа или по-малко) и ниска системна бионаличност (под 20%), с изключение на питавастатин [223, 224]. Ето защо, усилията на биомедицинските изследвания са насочени към създаване на различни стратегии за преодоляване на тези предизвикателства. Един от най-обещаващите сред тях е доставянето на статини като пролипозоми или липозоми [225-229]. 3) В допълнение, не всички туморни клетъчни линии / тумори са чувствителни към статини, което поне до известна степен обяснява противоречивите резултати, наблюдавани в клинични проучвания [230]. Необходими са надеждни биомаркери, за да се предскаже чувствителността на туморите / пациентите към лечение със статини. Резултатите от

транскриптомния анализ на четиринадесет туморни клетъчни линии и информацията за взаимодействието им с различни концентрации на статини бяха използвани за изготвяне на база данни за генна експресия. Очаква се този подход да допринесе за идентифицирането на чувствителни и устойчиви към действието на статините клетъчни линии. Валидността на идентифицирания профил на биомаркерите е потвърдена в допълнителни експерименти с независим набор от клетъчни линии [231].

Резултатите, които получихме вследствие на извършената работа показват, че и трите изследвани групи: метални комплекси с Шифови бази; метални комплекси с коджикова киселина и статини, дават основание за тяхното по-задълбочено проучване и имат потенциал за бъдещо приложение в онкофармакологията, който следва да бъде доразработен.

** посочените цитати са представени в Дисертационния труд*

6. ИЗВОДИ

ПОЛУЧЕНИТЕ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ РЕЗУЛТАТИ ПОЗВОЛЯВАТ
ДА БЪДАТ НАПРАВЕНИ СЛЕДНИТЕ

ПО-ВАЖНИ ИЗВОДИ:

1. Изпитваните комплекси на Zn(II), Cu(II), Co(II) и Ni(II) с Шифови бази и с Коджикова киселина намаляват в различна степен преживяемостта и 2D/3D растежа на използваните като експериментални модели клетъчни култури. Ефектът се увеличава с нарастване на приложената концентрация и време на въздействие.
2. Сред изпитваните метални съединения най-силно проявен цитотоксичен ефект при туморните клетки показват комплексите на Zn(II) и Co(II) с Коджикова киселина – ZnKoj и CoKoj, чиято ефективност надхвърля тази на един от най-широко използваните в онкологичната практика антинеопластични препарати – цисплатина.
3. Наблюдаван беше клетъчно-специфичен отговор, най-вероятно вследствие на различията в произхода, хистологичния тип и индивидуалните особености на туморите, от които са получени клетъчните линии.
4. Приложени в концентрации 1-200µg/ml статините значително намаляват преживяемостта и пролиферативната активност на култивираните в тяхно присъствие плъши саркомни клетки, трансформирани с *Rous sarcoma virus* щам *Schmidt-Ruppin* (LSR-SF-SR) и предизвикват цитопатологични изменения и смърт чрез апоптоза в тях.

7. СПРАВКА ЗА РИНОСИТЕ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

7.1. Оригинални приноси

1. Получени са оригинални данни за преживяемостта и пролиферативната способност на туморни и нетуморни клетки, предизвиканите цитопатологични изменения в тях и смъртта чрез апоптоза и некроза под влияние на новосинтезирани комплекси на Zn(II) и Cu(II) с Шифови бази, получени при кондензационна реакция между получени при кондензационна реакция между 2,6-диформил-р-крезол (diald) и аминокиселините β -аланин, L-левцин, α -валин и фенилаланин (7 броя) и комплекси на Zn(II), Co(II) и Ni(II) с Коджикова киселина (3 броя).
2. Анализът на установената зависимост между строежа/структурата и биологичната активност (цитотоксична / антитуморна) на изследваните метални комплекси ще улесни синтезирането на нови вещества с подобрени антитуморна ефективност и биологична поносимост.
3. За пръв път е доказана способността на статини (Ловастатин и Флувастатин) да намаляват преживяемостта и 2D/3D растежа на трансформирани с ретровирус плъши саркомни клетки (линия LSR-SF-SR), експресиращи онкогена *v-src*. При нарушена експресия и регулация на активността им, клетъчните аналози на този ген участват в патогенезата на различни ракови заболявания при човека и животните и са разпознати като мишени за насочена терапия в онкологията.

7.2. Приноси с потвърдителен характер

Потвърдена е високата чувствителност на клетъчните линии LSCC-SF-Mc29, клон E7 (трансплантируем хепатом в кокошка, предизвикан с миелоцитоматозния вирус Mc29) и LSR-SF-SF (трансплантируем сарком в плъх, индуциран с *Rous sarcoma virus* щам *Schmidt-Ruppin*) към цитотоксичното действие на съединения с различна структура и химични/физикохимични свойства.

8. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Постигнатите резултати дават основание за продължаване и разширяване на проучванията върху характеристиките на изследваните вещества, които биха допринесли за изясняване на механизмите на действие на тези нови съединения, притежаващи потенциал като бъдещи антитуморни агенти, както и за възможното тяхно модифициране към подобряване на биологичната им съвместимост, търсене на възможно синергично действие при комбинирано приложение с тяхно участие и др.

9. СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

- Alexandrova R, Dinev D, **GLAVCHEVA M**, Danova J, Yetik-Anacak G et al. Briefly about Anticancer Properties of Statins. Biomed J Sci & Tech Res 17(2)-2019. BJSTR. MS.ID.002975.

Цитирана в

El-Bondkly, A.A.M., El-Gendy, M.M.A.A. & El-Bondkly, A.M.A. Construction of Efficient Recombinant Strain Through Genome Shuffling in Marine Endophytic Fusarium sp. ALAA-20 for Improvement Lovastatin Production Using Agro-Industrial Wastes. Arab J Sci Eng 46, 175–190 (2021). <https://doi.org/10.1007/s13369-020-04925-5>

- Radostina Alexandrova, Tanya Zhivkova, Lora Dyakova, **MILENA GLAVCHEVA**. Cell Cultures as Reliable Models in Experimental Oncopharmacology. Acta morphologica et anthropologica, 25 (3-4), 11-16 (2018)
- **GLAVCHEVA, M.**, Z. Petrova, R. Spasov, R. Alexandrova. Cytotoxic effect of lovastatin and fluvastatin in virus-transformed animal cells. In the Proceedings of the XVth Workshop “Biological Activity of Metals, Synthetic compounds and Natural Products”, 9 December, 2020, Sofia, Bulgaria. Edited by D. Kadiysky and R. Alexandrova. Pp. 12-25. ISSN: 2367-5683.
- **GLAVCHEVA, M.**, D. Culita, G. Marinescu, R. Alexandrova. Novel Zn(II) complexes of Schiff bases with amino acid ligands as a possible antitumor agents. Synthesis, characterization and cytotoxic activity (Подготвена за печат).

10. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Доклади пред научни мероприятия в страната

- **Милена Главчева**, Доклад на тема “Комплекси на Zn(II) с шифови бази - потенциални агенти за борба с рака на гърдата”, стр. 31, Интердисциплинарен докторантски форум, 2016, Април 06-07, София
- **Milena Glavcheva**, Lora Dyakova, Desislav Dinev, Tanya Zhivkova, Katya Popova, Boyka Andonova-Lilova, Abedulkadir Abudalleh, Gabriela Marinescu, Daniela-Cristina Culita, Luminita Patron, Radostina Alexandrova, “Zn(II) complexes with Schiff bases decrease viability and proliferation of bovine kidney cells”, p. 71, Seminar of Ecology - 2016 with International Participation, Institute of Biodiversity and Ecosystem Research – BAS, 21-22 April 2016, Sofia, Bulgaria, постер
- **Milena Glavcheva**, Lora Dyakova, Desislav Dinev, Tanya Zhivkova, Katya Popova, Boyka Andonova-Lilova, Abedulkadir Abudalleh, Gabriela Marinescu, Daniela-Cristina Culita, Luminita Patron, Radostina Alexandrova, “Zn(II) complexes with Schiff bases: influence on viability and proliferation of cancer cells”, VIIth Workshop on Experimental Models and Methods in Biomedical Research, 16-18 May, 2016, доклад
- Катя Попова, **Милена Главчева**, Радостина Александрова, Доклад “Шифови бази и техните метални комплекси: биологична активност и потенциално приложение в медицината”, Първи младежки семинар “Пъстрият свят на биомедицината”, 25 май 2016 г., София, България
- Radostina Alexandrova, Desislav Dinev, **Milena Glavcheva**, Tanya Zhivkova, Abedulkadir Abudalleh, Boyka Andonova-Lilova, Lora Dyakova, Milena Georgieva, Katya Popova, George Miloshev, Svetla Georgieva, Gabriela Marinescu, Daniela-Cristina Culita, Luminita Patron, “Zn(II), Cu(II) and Co(II) complexes with Schiff bases – can they help us to fight against cancer”, Second Youth Biomedical Workshop with International Participation “Experimental Oncology and Tissue Engineering”, July 18-19, 2016

- Radostina Alexandrova, Desislav Dinev, **Milena Glavcheva**, Nelly Vasileva, Zdravka Petrova, Gabriela Marinescu, Daniela-Cristina Culita, Luminita Patron, “Metal complexes with Schiff bases: toxic effects in HeLa cells”, Second Youth Seminar “The Rainbow World of Medicine” 15 December 2016, Sofia, Bulgaria
- **Милена Главчева**, Здравка Петрова, Десислав Динев, Таня Живкова, Лора Дякова, Габриела Маринеску, Даниела-Кристина Кулица, Луминица Патрон, Радостина Александрова, „Цитотоксичен ефект на новосинтезирани метални [ZN(II), CO(II), NI(II)] комплекси с Шифови бази.”, Втори докторантски симпозиум „Молекулярната биология - нови хоризонти”, Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев”, 6 - 7 април 2017 г., София, България, стр. 40, доклад
- Zdravka Petrova, **Milena Glavcheva**, Desislav Dinev, Tanya Zhivkova, Lora Dyakova, Abedulkadir Mahdi Abudalleh, Gabriela Marinescu, Daniela Cristina Culita, Luminita Patron, Radostina Alexandrova. „Cell specific cytotoxic effect of newly synthesized metal complexes”, Осма работна среща „Експериментални модели и методи в биомедицинските изследвания, 14 - 16 юни 2017 г., Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей, БАН, София, България, доклад
- Radostina Alexandrova, Abedulkadir Abudalleh¹, Desislav Dinev, **Milena Glavcheva**, Tanya Zhivkova, Boyka Andonova-Lilova, Lora Dyakova, Georgi Semovski, Zdravka Petrova. “THE WORLD OF AUTOPHAGY”, Fourth Youth Biomedical Workshop with International participation “BioMedical World”, Institute of Experimental Morphology, Pathology and Anthropology with Museum at the Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria, July 13 – 14, 2017, доклад
- **Milena Glavcheva**, Zdravka Petrova, Tanya Zhivkova, Lora Dyakova, Milena Georgieva, George Miloshev, Gabriela Marinescu, Daniela-Cristina Culita, Luminita Patron, Radostina Alexandrova, „Cytotoxic activity of new Zn(II), Co(II) and Ni(II) complexes with kojic acid“, XXIII National Congress of the Bulgarian Anatomical Society with international participation, 5 – 7 Oct. 2017, Varna, Bulgaria, постер
- **Милена Главчева**, Радостина Александрова, Таня Живкова, Лора Дякова, Здравка Петрова, Десислав Динев, Габриела Маринеску, Даниела-Кристина Кулица, Луминица Патрон, “Влияние на метални комплекси с шифови бази или коджикова киселина върху преживяемостта и пролиферативната активност на туморни клетки“,

Дванадесета работна среща с международно електронно участие “Биологична активност на метали, синтетични съединения и природни продукти”, 27 – 29 ноември, София, България, доклад

- **Milena Glavcheva**, Desislav Dinev, Zdravka Petrova, Abedulkadir Abudalleh, Tanya Zhivkova, Lora Dyakova, Rossen Spasov, Boyka Andonova-Lilova, Milena Georgieva, Georgi Miloshev, Gabriela Marinescu, Daniela-Cristina Culita, Luminita Patron, Osama Azmy, Radostina Alexandrova, „Zn(II) complexes with different ligands as promising agents in the fight against breast cancer”, VII-ма Национална конференция с международно участие “Морфологични дни”, 8 - 10 юни 2018 г., Национален антропологичен музей, бул. Цариградско шосе 73, София, България, доклад

Доклади пред научни мероприятия в чужбина и пред международни научни мероприятия у нас

- **Milena Glavcheva**, Lora Dyakova, Desislav Dinev, Tanya Zhivkova, Katya Popova, Boyka Andonova-Lilova, Abedulkadir Abudalleh, Radoslav, Todorov, Gabriela Marinescu, Daniela-Cristina Culita, Luminita Patron, Radostina Alexandrova, “Zn (II) complexes with Schiff bases as potential agents for breast cancer treatment”, Abstract Book, p. 208, XV International Congress of Medical Sciences, Sofia, Bulgaria, 12-15 May, 2016, постер
- Katya Popova, **Milena Glavcheva**, Lora Dyakova, Desislav Dinev, Tanya Zhivkova, Boyka Andonova-Lilova, Abedulkadir Abudalleh, Gabriela Marinescu, Daniela-Cristina Culita, Luminita Patron, Radostina Alexandrova, “Schiff Bases”, VIIth Workshop on Experimental Models and Methods in Biomedical Research, 16-18 May, 2016, доклад
- Александрова Радостина, **Главчева Милена**, Дякова Лора, Георгиева Милена, Динев Десислав, Живкова Тая, Бойка Андонова-Лилова, Абудаллах Абдулкадир Милошев Георги, Маринеску Габриела, Кулица Даниела – Кристина, Патрон Луминита, “Zn(II) complexes with schiff bases decrease significantly viability and proliferation of human cancer cells”, COST TD action 1304 Zn-net 21-22.11.2016 Belfast

- **Milena Glavcheva**, Zdravka Petrova, Tanya Zhivkova, Lora Dyakova, Gabriela Marinescu, Daniela-Cristina Culita, Luminita Patron, Radostina Alexandrova. „Growth suppression effect of novel schiff base complexes of copper (CU) toward cancer and non-cancer cell lines“. 4th Black Sea International Immunology School (BSIIS), 20 - 22 Oct. 2017, Starosel, Bulgaria, доклад
- Radostina Alexandrova, Tanya Zhivkova, Lora Dyakova, Desislav Dinev, **Milena Glavcheva**, Abedulkadir Abudalleh, Reni Kalfin, Daniela-Cristina Culita, Gabriela Marinescu, Luminita Patron. „The power of 3d cancer cell colonies as model systems in experimental oncopharmacology.“First Annual Meeting, COST Action CA16119 CellFit, “In vitro 3-D total cell guidance and fitness”, 12-13 September 2017, Albena Resort, Bulgaria, доклад
- **Glavcheva Milena**, Marinescu Gabriela. Spasov Rossen, Culita Danela-Cristina, Petrova Zdravka, Patron Luminita, Alexandrova Radostina, „Cytotoxic Activity Of Bivalent Metal Complexes Of Kojic Acid In Cultured Human Cancer And Non-Cancer Cells”
- **Milena Glavcheva**, Tanya Zhivkova, Lora Dyakova, Radostina Alexandrova, “Ni(II) complexes with Mannich bases affect viability and proliferation of rat tumor and non-tumor (bone marrow, macrophages, lymphocytes) cells”, 5th European Congress of Immunology, September 2 – 5, 2018 in Amsterdam

Участие в Организационните комитети на научни форуми:

- Конференцията “Dietary supplements vs. food biofortification and the gut microbiome: human and health outcomes”, Zinc-Net – The Cost Action for Zinc Biology, 22-23 март 2016 г., Sofia, Bulgaria
- Младежкия организационен комитет на Седма Работна среща „Експериментални модели в биомедицинските изследвания”, 16-18 май, 2016 г., София

- Младежкия организационен комитет на XI Работна среща „Биологична активност на метали, синтетични материали и природни продукти”, 14-16 декември, 2016 г., София
- Трета младежка работна среща по биомедицина с международно участие „Biomedical World”, проведена на 30 януари – 02 февруари 2017 г. , ИЕМПАМ - БАН, София, България;
- Трети младежки семинар за студенти и млади учени „Пъстрият свят на биомедицината” (The Rainbow World of BioMedicine), проведен на 3 - 4 май 2017 г. , ИЕМПАМ - БАН, София, България;
- VIIIth Workshop on Experimental Models and Methods in Biomedical Research, 14 - 16 May 2017, ИЕМПАМ - БАН, Sofia, Bulgaria;
- Четвърта младежка работна среща по биомедицина с международно участие „Biomedical World”, проведена на 13 - 14 юли 2017 г. , ИЕМПАМ - БАН, София, България;
- XIIth Workshop with International Electronic Participation on Biological Activity of Metals, Synthetic Compounds and Natural Products, 27 - 29 November, 2017, ИЕМПАМ - БАН, Sofia, Bulgaria;
- Четвърти младежки семинар за студенти и млади учени „Пъстрият свят на биомедицината” („The Rainbow World of BioMedicine”), проведен на 4 - 5 декември 2017 г., ИЕМПАМ - БАН, София, България.

Участие в проекти:

- Договор ДФНП-17-73/28.07.2017 г., финансиран по Програмата за подпомагане на млади учени в БАН за изпълнение на проект на тема „Изследване на нови метални комплекси като потенциални агенти с антитуморна активност” – ръководител;
- Договор по проект EU CA15135 “Multi-target paradigm for innovative ligand identification in the drug discovery process (MuTaLig)” (2016 – 2020);
- Договор по проект EU CA15138 "European Network of Multidisciplinary Research and Translation of Autophagy knowledge (TRANSAUTOPHAGY)" (2016 – 2020);
- Договор по проект EU CA16119 “In vitro 3-D total cell guidance and fitness” (2017 – 2021);
- Договор №BG05M2OP001-2.009-0019-C01/02.06.2017 г. на тема: „Изграждане и развитие на млади висококвалифицирани изследователи и преподаватели за иновативни интердисциплинарни изследвания от полза за биомедицината. Проектът е финансиран по Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси“, съфинансирана от Европейския социален фонд на Европейския съюз. Ръководител: проф. Нина Атанасова, дбн, ИЕМПАМ-БАН

11. БЛАГОДАРНОСТИ ЗА ОСИГУРЕНА ПОДДРЕПА И СЪТРУДНИЧЕСТВО

Синтезът и физико-химичното охарактеризиране на веществата е осъществено от групата на проф. д-р Луминица Патрон, Институт по физикохимия «Илие Мургулеску», Букурещ, Румъния

Изследванията се осъществиха с подкрепата на:

- Фонд “Научни изследвания” при МОН, България с дог. № ДФНИ-Б-02-30/12.12.2014 г.;
- Българска академия на науките с дог. № ДФНП-17-73 от 28.07.2017 г.;
- Договор по проект BG05M2OP001-2.009-0019-C01/02.06.2017 г., ОПНОИР;
- Договор за двустранно сътрудничество между Българската академия на науките (ИЕМПАМ) и Румънската академия (Институт по физикохимия в Букурещ и Институт по химия в Тимишоара) на тема: “Приложение на човешки и животински клетъчни култури за изследване на нови материали с обещаваща биологична активност”;
- Договор № ДКОСТ 01-10 с ФНИ за изпълнение на EU CA15135 “Multi-target paradigm for innovative ligand identification in the drug discovery process (MuTaLig)”
- Договор № ДКОСТ 01-16 с ФНИ за изпълнение на EU CA15138 "European Network of Multidisciplinary Research and Translation of Autophagy knowledge (TRANSAUTOPHAGY)“
- Договор № ДКОСТ 01-19 с ФНИ за изпълнение на EU CA16119 “In vitro 3-D total cell guidance and fitness”

Изказвам своята сърдечна признателност към научния ми ръководител, професор Радостина Александрова, доктор, за вложените професионални познания и всеотдайност, за подсигурената финансова подкрепа и създадената изследователска среда, необходими за осъществяването на настоящия труд.

Благодарна съм към ръководството на ИЕМПАМ-БАН за осигурените условия за провеждането на настоящото изследване и възможността за участието ми в проекта BG05M2OP001-2.009-0019-C01/02.06.2017 г. по ОПНОИР.

Благодаря за любезното и професионално съдействие на колегите от работния ми екип, както и на колегите от ИЕМПАМ-БАН и Института по молекулярна биология – БАН за оказаното съдействие при провеждането на молекулярно-биологичните тестове и работата с флуоресцентен микроскоп (Leica DM 5000B).