

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ  

---

ИНСТИТУТ ПО ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА МОРФОЛОГИЯ, ПАТОЛОГИЯ  
И АНТРОПОЛОГИЯ С МУЗЕЙ

ИННА АЛЕКСАНДРОВНА СУЛИКОВСКА

**Оптимизиране и адаптиране на метода за определяне на  
фототоксичност *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test, към  
LED – слънчев симулатор *Helios-iO***

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен  
**„ДОКТОР”**

Научна специалност „Биохимия”, шифър 01.06.10

**Научен консултант:** доц. И. Илиев

**София, 2022 г.**

Дисертацията е написана на 147 страници и е онагледена с 16 таблици и 60 фигури. Библиографската справка обхваща 322 източника.

Експерименталната работа, свързана с изложените в представения дисертационен труд резултати, е извършена основно в лабораториите на Института по експериментална морфология, патология и антропология с музей (ИЕМПАМ) - БАН.

Екстрактите от растения са получени от доц. Ивайло Иванов (Медицински университет – София) и доц. Донка Ташева (СУ „Свети Климент Охридски“). Производните на пептида (KLAFLAK)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> са получени от проф. д-р Данчо Даналев и д-р Сирин Джабер (ХТМУ-София, катедра „Биотехнология“). Тиено[2,3-d]пиримидините са получени от доц. д-р Анелия Маврова (ХТМУ-София) и проф. д-р Деница Янчева (ИОХЦФ-БАН).

Дисертационният труд е одобрен и насочен за защита на разширено заседание на секция „Патология“, ИЕМПАМ-БАН, проведено на 01.06.2022 г.

Защитата на Дисертационния труд ще се състои на 2 август 2022 г. от 11.00 часа на открито заседание на Научно жури в състав:

**Вътрешни членове:**

Проф. Светлозара Любомирова Петкова, доктор (ИЕМПАМ-БАН) – председател, становище  
Проф. Людмил Пенюв Кирацов, дбн (ИЕМПАМ-БАН) – рецензия

**Външни членове:**

Доц. Людмила Владимирова Кабаиванова, доктор (ИМикБ-БАН) – рецензия  
Проф. Румяна Силвиева Миронова, дн (ИМБ-БАН) – становище  
Доц. Ваня Николова Мантарева, дн (ИОХЦФ-БАН) – становище

Материалите по защитата се намират на разположение в канцеларията на ИЕМПАМ-БАН, ул. „Акад. Георги Бончев“, Бл. 25, стая 209.

## БЛАГОДАРНОСТИ

*Искрено благодаря на научния си консултант доц. И. Илиев (ИЕМПАМ-БАН) за помощта и напътствията, които направиха възможно осъществяването на това изследване. Благодаря на ръководството на ИЕМПАМ-БАН в лицето на проф. д-р С. Петкова, проф д-р Д. Кадийски, доц. д-р Е. Петрова и доц. д-р К. Димитрова за административната подкрепа, която ми оказаха, при оформяне на документацията през целия период на докторантурата. Благодаря на проф. М. Димитрова (ИЕМПАМ-БАН) за помощта при работата с растителните екстракти. Благодаря на проф. Д. Даналев, ас. С. Джабер и доц. А. Маврова (ХТМУ) за любезно предоставените за изследване пептиди и аминопиримидини. Благодаря на доц. Х. Андреева (ИЕ-БАН) за съдействието, при охарактеризиране физичните характеристики на слънчевият симулатор. Благодаря на доц. Н. Михайлова (ИМикБ-БАН), гл. ас. Р. Христова и гл. ас. В. Джельова (ИМБ-БАН) за оказаното съдействие при флуориметричния анализ. Изказвам благодарност на колектива от секция „Патология“ – ИЕМПАМ за помощта и оказаното съдействие, при експерименталната работа и оформянето на дисертационния труд. Сърдечни благодарности на семейството и приятелите ми за разбирането, търпението и подкрепата по време на изработването на този дисертационен труд.*

*За финансовата подкрепа благодаря на:*

Проект № КП-06-Н31/1 на тема: „Селективни природни инхибитори на пост-пролин разграждащи пептидази от български лечебни растения като потенциални средства за превенция и терапия на онкологични заболявания“, финансиран по „Конкурс за финансиране на фундаментални научни изследвания – 2019 г.“, към Фонд „Научни изследвания“.

МОН – Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“, одобрена с РМС №658 от 14.09.2018 г., договор ДО1-217/30.11.2018 и споразумения ДО1-323/18.12.2019, ДО1-358/17.12.2020 и ДО1-278/03.12.2021.

## Използвани съкращения

LED	Диодна лампа (Light-emitting diode lamp)
MEDs	Минимална ефективна доза на облъчване
HMG-CoA	Редуктазен инхибитор 3-хидрокси-3-метилглутарил коензим А
BRAF	Серин/треонинова протеинкиназа B-raf
АО	Акридин оранж
NRU	Neutral Red Uptake
PIF	Photo-irritancy factor
MPE	Mean Photo Effect
OECD	Организация за икономическо сътрудничество и развитие
FDA	Американската администрация по храните и лекарствата
ATCC	American Type Culture Collection
FAP- $\alpha$	Фибробласт активиращ протеин - $\alpha$
PI	Пропидиев йодид
DAPI	4',6-диамино-2-фенилиндол
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	Фетален телешки серум
EDTA	Етилендиаминтетраоцетна киселина
PBS	Phosphate Buffered Saline
MTT	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолиум бромид
CC <sub>50</sub>	Цитотоксична концентрация, при която се наблюдава 50% токсичност
DMSO	Диметил сулфоксид
IC <sub>50</sub>	Инхибираща концентрация, при която се наблюдава 50% ефект
SD	Стандартно отклонение
FC <sub>50</sub>	Фототоксична концентрация, при която се наблюдава 50% ефект
FC <sub>10</sub>	Фототоксична концентрация, при която се наблюдава 10% ефект
FC <sub>70</sub>	Фототоксична концентрация, при която се наблюдава 70% ефект
FC <sub>90</sub>	Фототоксична концентрация, при която се наблюдава 90% ефект

## СЪДЪРЖАНИЕ

I. УВОД.....	6
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ .....	7
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ .....	8
1.    Материали .....	8
1.1.    Светлинен източник .....	8
1.2.    Клетъчни линии.....	8
1.3.    Хранителни среди за клетъчно култивиране .....	8
1.4.    Изследвани вещества .....	9
1.4.1.    Вещества използвани за валидиране на слънчевият симулатор .....	9
1.4.2.    Изследвани вещества с природен и синтетичен произход.....	9
1.5.    Багрила за оцветяване на цитологични микроскопски препарати .....	10
2.    Методи.....	10
IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ .....	11
1.1.    Определяне характеристиките на слънчев симулатор LE-9ND55-H.....	11
1.2.    Валидиране на слънчевият симулатор при <i>in vitro</i> експерименти.....	13
1.3.    Морфологичен анализ.....	16
1.4.    Изследване за фототоксичност на природни продукти .....	18
1.5.    Изследване за потенциална антитуморна активност на природни продукти.....	20
1.6.    Изследване механизма на антитуморно действие на природни продукти.....	24
1.7.    Тест за безопасност на новосинтезирани пептиди.....	31
1.8.    Тест за безопасност на химично синтезирани съединения .....	33
1.9.    Изследване за потенциална антитуморна активност на химично синтезирани съединения .....	36
V. ОБОБЩЕНИЕ .....	39
VI. ИЗВОДИ.....	40
VII. ОРИГИНАЛНИ ПРИНОСИ.....	40
VIII. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА.....	41
IX. ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА .....	45

## I. УВОД

Фоточувствителността е една от най-честите кожни странични реакции, предизвикани от прилагане на фотоактивни вещества, присъстващи в състава на лекарствени и козметични препарати. Те често водят до намаляване комфорта на пациента, изискват хоспитализация, допълнително лечение и ограничаване на тяхната употреба. Броят на случаите на фототоксичност непрекъснато се увеличава. Причините за това могат да бъдат намерени в прекомерно излагане на слънчева светлина, продиктувано от естетическата стойност на тена, повишаване на агресивността на слънчевото излъчване, свързано с климатичните промени и нарастващия брой на потенциално фоточувствителни вещества, използвани във фармацията и козметиката.

Механизмите на индуцираната от лекарства фоточувствителност са сложни и се наблюдават на клетъчно, молекулярно и биофизично ниво. Фотовъзбуждането на активните съединения на лекарствата предизвикват многопосочни биологични реакции, включително образуването на активни форми на кислород, предизвикващи различни токсични реакции. Тези реакции допринасят към появата на симптоми като еритема, подуване, мехури, парене, сърбеж, хиперпигментация на кожата и др.

Към този момент са определени няколкокласови лекарства, включително антибиотици, нестероидни противовъзпалителни средства, лекарства, използвани при терапия на сърдечно-съдови заболявания (диуретици, антиаритмични, антихипертензивни лекарства), лекарства, действащи върху централната нервна система (невролептици, антидепресанти), антидиабетни и противоракови, причиняващи фототоксични ефекти. Рискът от фототоксични реакции не зависи от произхода на даденото вещество, дали то е синтетично или е с природен произход. Затова всички вещества, които се прилагат във фармацията, медицината и козметиката, е препоръчително да бъдат тествани за идентифициране на потенциалните рискове, които могат да причинят в комбинация с излагане на слънчева светлина. Тестовите за безопасност на химични субстанции са регламентирани в документи на Европейската агенция по лекарствата и Американската администрация за храните и лекарствата. Понастоящем тестът *BALB 3T3 NRU phototoxicity test* е препоръчителен и подходящ *in vitro* тест за оценка на фототоксичен потенциал на вещества.

Провеждането на тестове за фотобезопасност изисква използваният слънчев симулатор максимално да наподобява по физически параметри естествената слънчева светлина. Съществува голямо разнообразие от изкуствени светлинни източници, които могат успешно да се използват за тестване на вещества за фототоксичност при *in vitro* и *in vivo* условия. Най-често използваните светлинни източници са: въглеродна дъгова лампа, халогенна дъгова лампа, кварцова волфрамова халогенна лампа, ксенонова дъгова лампа, живачна ксенонова лампа, аргонова дъгова лампа и диодна лампа. Симулаторите на слънчева светлина трябва да отговарят на редица изисквания: светлинен спектър, хомогенност на осветяването, стабилност и мощност на светлинния поток.

В качеството си на симулатор на слънчева светлина в нашите изследвания избрахме диодна лампа. Диодните симулатори са по-подходящи при използване за научно-изследователски цели, тъй като те са леснопреносими с малки размери и тегло, широкодостъпни (относително ниска цена), с ниско топлинно излъчване, малка енергийна консумация, стабилен спектър в периода на експлоатация и др.

В настоящата дисертация ние изследваме възможности за приложение на диоден симулатор на слънчева светлина за *in vitro* оценка на фотобезопасност на природни продукти и синтетични съединения с потенциална антитуморна активност.

## II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на този дисертационен труд е:

Да бъде оптимизиран и адаптиран методът за определяне на фототоксичност *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test, към LED - слънчев симулатор (Helios-iO, модел LE-9ND55-H - 5500K), с цел бързо и качествено изследване на фототоксичност на вещества със синтетичен и природен произход с потенциална антитуморна активност.

За изпълнение на поставената цел бяха формулирани следните основни задачи:

1. Измерване физичните характеристики на излъчената светлина (светлинен спектър, мощност, хомогенност на осветяване и др.) от LED - слънчев симулатор (Helios-iO, модел LE-9ND55-H - 5500K).
2. Оптимизиране и адаптиране на протокола за определяне на фототоксичност *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test, към LED - слънчевият симулатор.
3. Определяне ефективността на LED - слънчевия симулатор при изследване на различни видове съединения за фототоксичност.
4. Демонстриране на практика възможността за използване на слънчевия симулатор при тестове за фотобезопасност на вещества със синтетичен и природен произход с потенциална антитуморна активност.

### III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### 1. Материали

##### 1.1. Светлинен източник

Слънчевият симулатор, който използвахме в нашите експерименти е светодиодна лампа – Helios-iO (SERIC Ltd., Tokyo, Japan). Спектърът на използваната лампа е регистриран с помощта на спектрометър на фирмата Ocean Optics, модел HR4000 (Ocean Optics Inc., Florida, USA) с оптична разделителна способност 0.03 nm (ширина на полувисочина).

За определяне на светлинната мощност на лампата е използван оптичен измерител на мощност PM 100D със сензор S120VC (Thorlabs Inc., North Newton, Kansas, USA). Работният му обхват по дължина на вълната е 200 - 1100 nm, а по мощност от 50 nW до 50 mW. Линейността на сензора е  $\pm 0.5\%$ , а неопределеността на измерването за работната област (280-980 nm) е по-малка от  $\pm 5\%$ . При оценка на разпределението на оптичната мощност върху 96-яковка плака за клетъчно култивиране беше извършено предварително настройване на измерената дължина на вълната от уреда. За целта бе използван зелен филтър с известен спектър на пропускане. По време на измерванията на мощността филтърът беше поставен пред сензора за измерване на мощност. Центърът на спектралната линия на пропускане на филтъра бе зададен, като работна дължина на вълната за измервателя на мощност.

##### 1.2. Клетъчни линии

- Миши ембрионални фибробласти (BALB/c 3T3), ATCC® №. CRL-1658™.
- Човешки нормални фибробласти (BJ), ATCC® №. CRL-2522™.
- Човешки нетуморогенни епителни клетки (MCF-10A), ATCC® № CRL-10317™.
- Човешки кератиноцити (HaCaT) – ATCC® № PCS-200-011™
- Луминален тип А рак на гърдата (MCF-7), ATCC® № HTB-22™
- Базален тип рак на гърдата (MDA-MB-231), ATCC® № HTB-26™
- Недребноклетъчен рак на бял дроб (A-549), ATCC® № CCL-185™
- Недребноклетъчен рак на бял дроб (H1299), ATCC® № CRL-5803™
- Колоректален карцином (HT-29), ATCC® № HTB-38™
- Рак на шийката на матката (HeLa), ATCC® № CCL-2™
- Хепатоцелуларен карцином (HepG2), ATCC® № HB-8065™
- Рак на простатата (PC-3), ATCC® № CRL-1435™

##### 1.3. Хранителни среди за клетъчно култивиране

За целите на клетъчното култивиране беше използвана хранителна среда Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) с 4.5 g/l глюкоза и L-глутамин (Sigma–Aldrich, Code:1002439-26), 10% Фетален Телешки серум (Sigma–Aldrich, Code: F7524) и антибиотици Пеницилин/Стрептомицин (Sigma–Aldrich, Code: P4333-100ML) в крайна концентрация съответно 100 единици и 100  $\mu\text{g/ml}$ . При култивирането на MCF-10A и MCF-7 към хранителната среда бяха допълнително добавени растежни фактори: инсулин, холерен токсин, хидрокортизон и епидермален растежен фактор.



## 1.4. Изследвани вещества

### 1.4.1. Вещества използвани за валидиране на слънчевият симулатор

- Акридин оранж (Loba chemie Ltd., Fischamend, Austria)
- Радахлорин (Rada-Pharma Ltd., Moscow, Russia)
- Етерично масло от здравец (предоставено от доц. И. Колев, МУ - Варна)

### 1.4.2. Изследвани вещества с природен и синтетичен произход

Растителните екстракти са предоставени от доц. И. Иванов, (МУ – София, Катедра по биоорганична химия и биохимия) и доц. Д. Ташева (СУ „Свети Климент Охридски”, Факултет по химия и фармация).

- Етилацетатен екстракт от *Tanacetum vulgare L.* (TVA)
- 80% етанолов екстракт от *Epilobium parviflorum Schreb* (EPE)
- 80% етанолов екстракт от *Geranium sanguineum L* (GSA).
- Етилацетатен екстракт от *Cotinus coggygria Scop* (ССА)

### Синтетични съединения

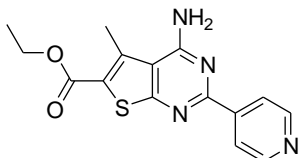
Синтетичните пептиди са предоставени от проф. д-р. инж. Данчо Даналев, ХТМУ-София, катедра „Биотехнология”.

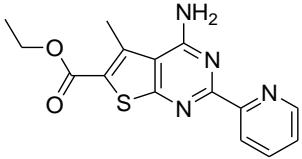
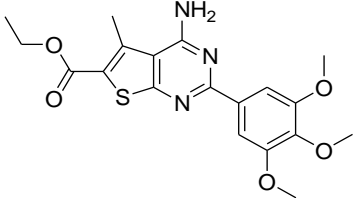
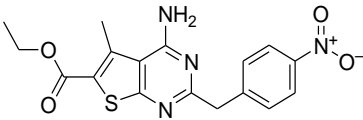
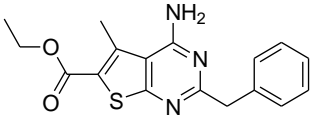
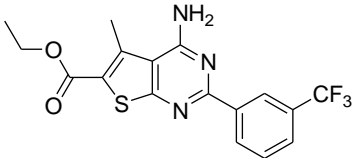
Таблица 1. Структура и аналитични данни за изследваните пептиди.

Пептиди	Структура	Молекулна формула	Моларна маса
Si1	(KLAKLAK) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	C <sub>71</sub> H <sub>135</sub> N <sub>21</sub> O <sub>15</sub>	1522.05
Si4	<b>1,8-NphtG</b> -(KLβ-AKLβ-AK) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	C <sub>85</sub> H <sub>142</sub> N <sub>22</sub> O <sub>18</sub>	1760.17
Si5	(KLβ-AKLβ-AK) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	C <sub>71</sub> H <sub>135</sub> N <sub>21</sub> O <sub>15</sub>	1523.85
Si9	<b>1,8-NphtG</b> -(KLAKLAK) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	C <sub>85</sub> H <sub>142</sub> N <sub>22</sub> O <sub>18</sub>	1760.65
Si10	<b>Caf</b> -(KLAKLAK) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	C <sub>81</sub> H <sub>145</sub> N <sub>21</sub> O <sub>17</sub>	1686.45
Si12	<b>Caf</b> -(KLβ-AKLβ-AK) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	C <sub>81</sub> H <sub>145</sub> N <sub>21</sub> O <sub>17</sub>	1687.35
Si16	(Kn-LAKn-LAK) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	C <sub>71</sub> H <sub>135</sub> N <sub>21</sub> O <sub>15</sub>	1523.30
Si17	<b>1,8-NphtG</b> -(Kn-LAKn-LAK) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	C <sub>85</sub> H <sub>142</sub> N <sub>22</sub> O <sub>18</sub>	1760.22
Si18	<b>Caf</b> -(Kn-LAKn-LAK) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	C <sub>81</sub> H <sub>145</sub> N <sub>21</sub> O <sub>17</sub>	1685.15

Тиено[2,3-d]пиримидините са предоставени от доц. д-р Анелия Маврова – ХТМУ-София и проф. д-р Деница Янчева – ИОХЦФ-БАН.

Таблица 2. Структура и аналитични данни за Тиено[2,3-d]пиримидини

Съединение	Молекулна маса и формула
Ethyl 4-Amino-5-methyl-2-(pyridin-4-yl)thieno[2,3-d]pyrimidine-6-carboxylate hydrochloride (1)	Mw 314.37 

<p>Ethyl 4-Amino-5-methyl-2-(pyridin—2-yl) Thieno[2,3-d]pyrimidine-6-carboxylate (2)</p>	<p>Mw 314.37</p> 
<p>Ethyl 4-Amino-5-methyl-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl) thieno [2,3-d]pyrimidine-6-carboxylate (3)</p>	<p>Mw 403.45</p> 
<p>Ethyl 4-Amino-5-methyl-2-(4-nitrobenzyl) Thieno [2,3-d] Pyrimidine-6-carboxylate (4)</p>	<p>Mw 372.4</p> 
<p>Ethyl 4-Amino-2-benzyl-5-methyl-thieno[2,3-d] pyrimidine-6-carboxylate (5)</p>	<p>Mw 327.4</p> 
<p>Ethyl 4-Amino-5-methyl-2-(3-(trifluoromethyl) Phenyl) Thieno [2,3-d] Pyrimidine-6-carboxylate (6)</p>	<p>Mw 381.37</p> 

### 1.5. Багрила за оцветяване на цитологични микроскопски препарати

- Giemsa's azur eosin methylene blue solution (Merck KgaA, Code: 109204)
- May-Grünwald's eosine-methylene blue solution (Merck KgaA, Code: 101424)
- Акридин оранж (АО) (Sigma–Aldrich, Code: A9231)
- Пропидиев йодид (PI) (Sigma–Aldrich, Code: P4864)
- DAPI (BioChemica, Code: A1001)

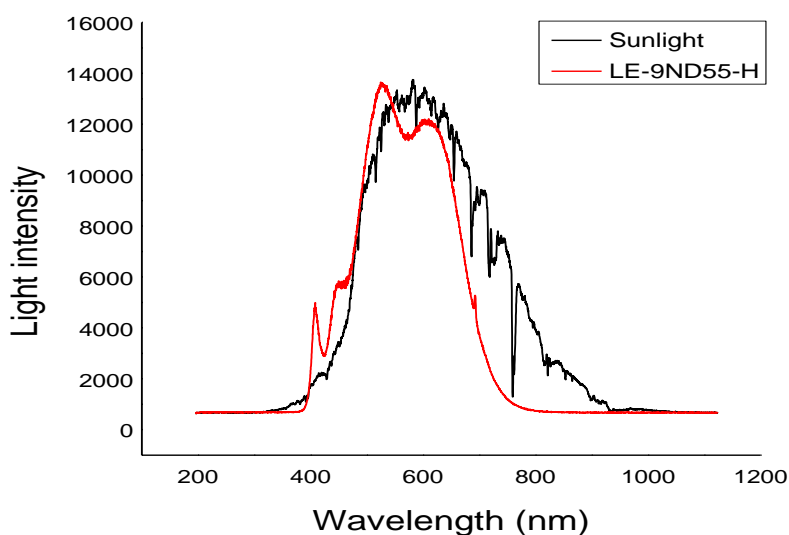
## 2. Методи

- 1.1. Клетъчно култивиране на адхерентни клетъчни култури
- 1.2. Определяне на клетъчна жизненост и концентрация с Trypan blue
- 1.3. Метод за определяне на цитотоксичност (BALB/3Т3 NRU test)
- 1.4. Тест за фототоксичност (BALB/3Т3 NRU PT test)
- 1.5. Метод за определяне на клетъчна пролиферация (MTT test)
- 1.6. Светлинна микроскопия (оцветяване по Май-Грюнвалд Гимза)
- 1.7. Двойно флуорохромиране с акридин оранж и пропидиев йодид
- 1.8. Оцветяване с DAPI
- 1.9. Флоуцитометричен анализ на клетъчен цикъл
- 1.10. Флоуцитометричен анализ за определяне на апоптоза и некроза
- 1.11. Статистически анализ на резултатите

#### IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

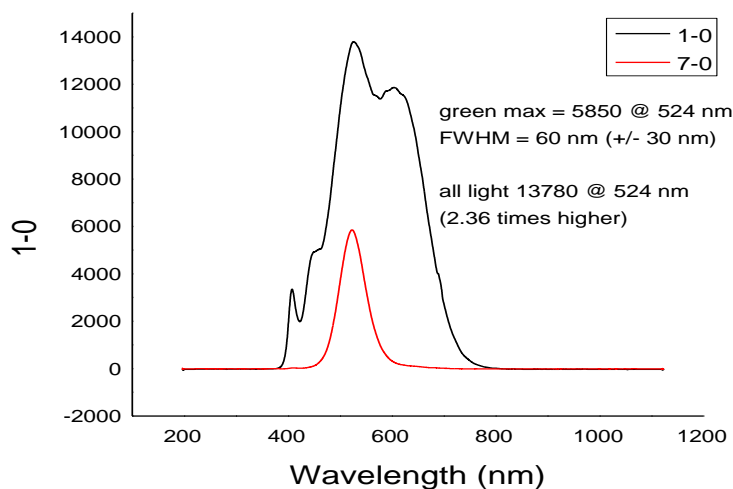
##### 1.1. Определяне характеристиките на слънчев симулатор LE-9ND55-H

Използваният светлинен източник за определяне на фототоксичен ефект е светодиодна лампа – изкуствен симулатор на слънчева светлина Helios-iO, модел LE-9ND55-H - 5500K, закупен от фирмата SERIC Ltd. Във фирмените документи придружаващи LED - лампата има описание на някои от най-важните нейни характеристики. Но липсва информация за сходството със спектъра на пряката слънчева светлина. Ето защо първоначално определихме спектъра на слънчевия симулатор и спектъра на естествената слънчева светлина, след което ги сравнихме (Фигура 1). Спектралните данни показват значително сходство между спектъра на диодния светлинен източник и слънчевата светлина. При изкуствения светлинен източник се наблюдава непрекъснат спектър с дължина на вълната от 360 до 950 nm. Това е изключително важно при използване на изкуствения симулатор за извършване на експерименти за определяне на фототоксичност.



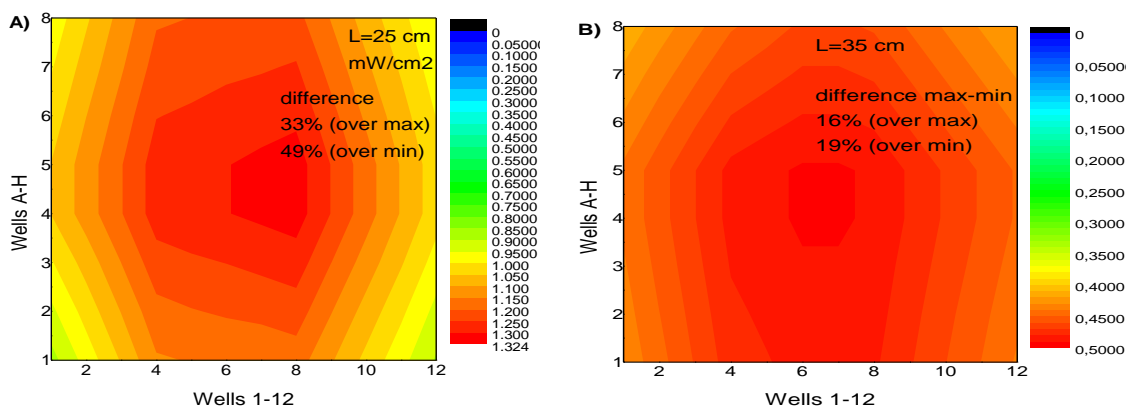
Фигура 1. Спектър на слънчевият симулатор LE-9ND55-H сравнен със спектъра на естествената слънчева светлина.

Измерването на светлинната мощност изисква задаване в измерителя на дължина на вълната на лъчението. Поради това, беше използван зелен филтър, чийто спектър на пропускане беше също измерен с помощта на спектрометъра и сравнен със спектъра на лампата. Резултатът от това изследване е показан на Фигура 2.



Фигура 2. Светлинна мощност на слънчев симулатор LE-9ND55-H. За измерване на мощността е използван зелен филтър.

Бе изследвано и разпределението на плътността на мощността на лъчението върху двумерен модел на 96-ямкова плака за две разстояния между центъра на диодната матрица на лампата и центъра на плаката (между ямки 6-7 и D-E),  $L = 25$  cm и  $L = 35$  cm. Разпределението за тези два случая е показано на фигура 3. Съгласно това разпределение, при разстояние от лампата до плаката  $L = 25$  cm и време на облъчване 10 min, получената доза е 0.64 J, а от ямките в краищата на плаката – 0.44 J. При тестовете за фототоксичност се ползват само вътрешните ямки (2-11 и B-G) от 96-ямковата плака за клетъчно култивиране, поради което разликата в плътността на мощността на осветяване от центъра на плаката до крайните използвани ямки не надвишава 5 %, при разстояние от центъра на диодната матрица 25 cm.



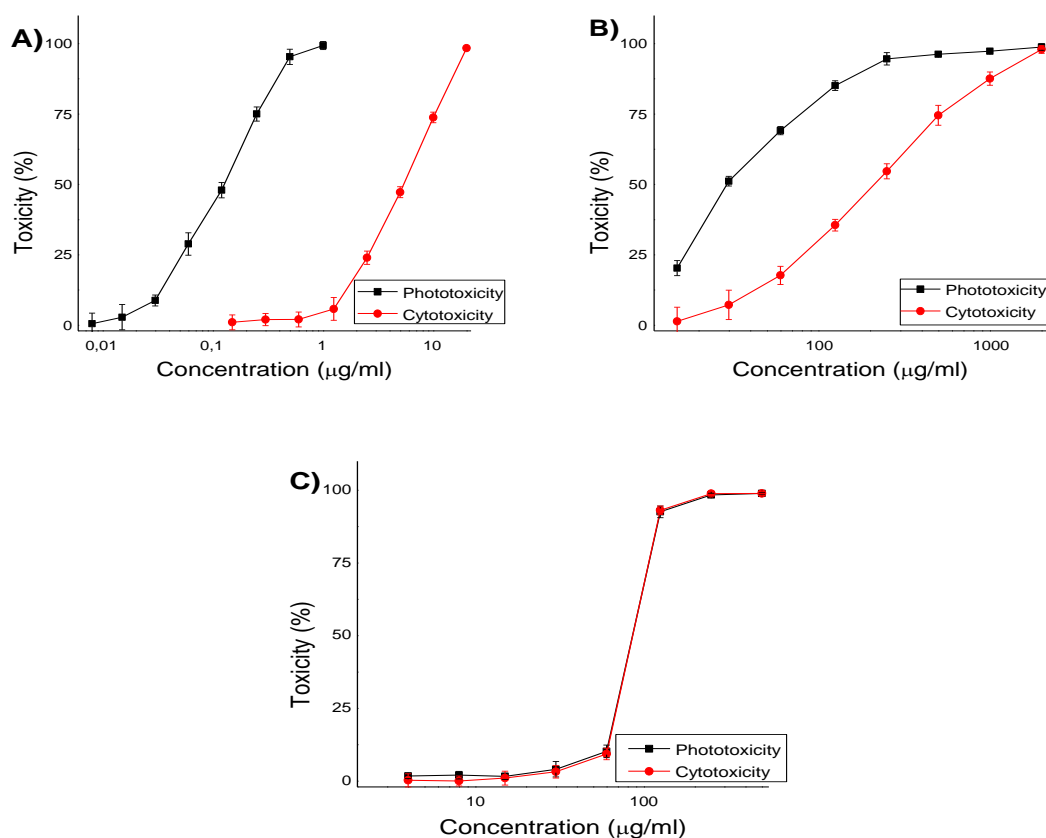
Фигура 3. Разпределение плътността на мощността на лъчението върху двумерен модел на 96-ямкова плака за две разстояния между центъра на диодната матрица на лампата и центъра на плаката. А) 25 cm. и В) 35 cm.

Определените по-горе физически характеристики на излъчената светлина, показват че слънчевият симулатор LE-9ND55-H покрива изискванията за светлинен източник, определени в стандартния протокол за оценка на фототоксичност.

## 1.2. Валидиране на слънчевият симулатор при *in vitro* експерименти.

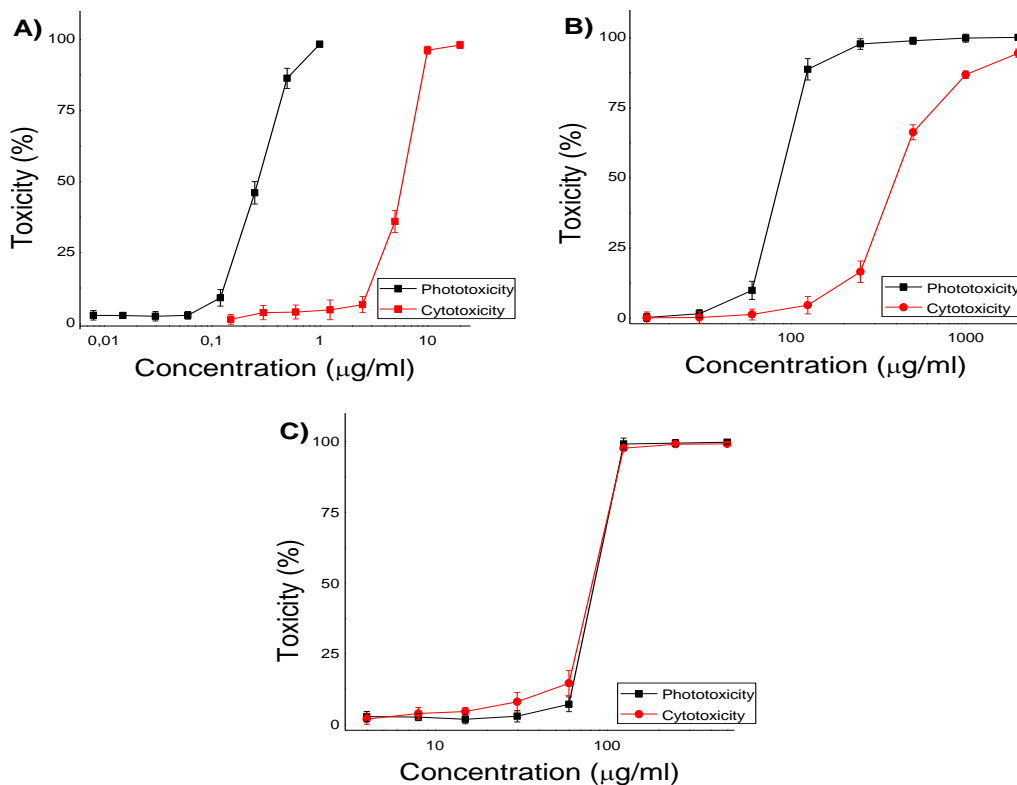
За да бъде валидиран слънчевият симулатор трябваше да се тества в лабораторни условия за определяне на фототоксичност по стандартен протокол. Тестовите вещества бяха подбрани така, че да обхващат широк кръг от синтетични и природни продукти, които се използват в науката, козметиката, фармацевтиката и медицината. Акридин оранж е синтетично съединение с много висока фототоксичност. Използва се във флуоресцентната микроскопия, като флуорохром. Етеричното масло от здравец от друга страна е природен продукт, при който не се наблюдава фототоксичност. Средно положение заема радакхлоринът, който е изолиран от микроводорасли и се използва широко при фотодинамична терапия. Клетъчните линии, които бяха използвани при *in vitro* експериментите бяха избрани, като модел на здрава тъкан. Мишият модел BALB/3T3 бе използван като стандарт за тестване на фототоксични вещества, приет от Световната здравна организация. Освен това в изследванията включихме и човешки *in vitro* модели на здрава тъкан: VJ (фибробласти) и MCF-10A (епителни клетки).

Първата серия от *in vitro* експерименти за определяне на цито- и фототоксичност извършихме върху мишата клетъчна линия BALB/3T3 (Фигура 4). Резултатите показват че наблюдаваните ефекти са от дозозависим тип (сигмоидална крива доза-отговор). При Акридин оранж се наблюдава изключително силен фототоксичен ефект (Фигура 4, А). При радакхлоринът фототоксичният ефект е значително по-слаб, докато при етеричното масло от здравец такъв ефект практически не се наблюдава.

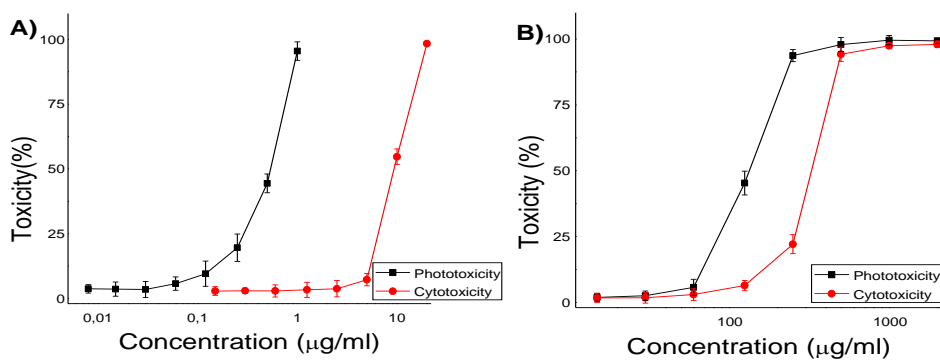


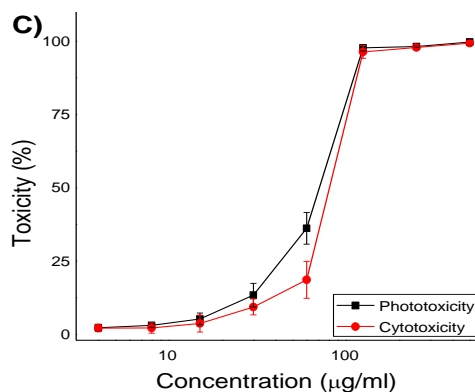
Фигура 4. Фото- и цитотоксичност определени при клетъчната линия BALB/3T3 клон А31. А) Акридин оранж, В) Радакхлорин и С) Етерично масло от здравец.

Това потвърждава на практика литературните данни за фототоксичността на използваните вещества. От тук можем да направим извода, че тестваният светлинен източник е подходящ за изследване на фототоксичност при *in vitro* условия. Същите експерименти проведохме и върху човешките клетъчни линии MCF-10A и VJ. Получените резултати са сходни с тези при клетъчната линия BALB/3T3 (Фигури 5 и 6). Етеричното масло от здравец и при трите клетъчни линии не е фототоксично. Ето защо в бъдещи експерименти за определяне на фототоксичност то може да бъде използвано, като негативна контрола (стандарт за не фототоксично вещество). Поради своята изключително висока фототоксичност акридин оранж може да се използва, като позитивна контрола, която е индикатор за коректното изпълнение на протокола за определяне на фототоксичност. Радахлоринът има умерена фототоксичност, която позволява да бъде използван в медицината като фотосенсибилизатор с малко странични ефекти.



Фигура 5. Фото- и цитотоксичност определени при клетъчната линия MCF-10A. А) Акридин оранж, В) Радахлорин и С) Етерично масло от здравец.





Фигура 6. Фото- и цитотоксичност определени при клетъчната линия ВJ.

А) Акридин оранж, В) Радахлорин и С) Етерично масло от здравец.

На база получените сигмоидални криви бяха изчислени средните стойности на  $CC_{50}$  за цито- и фототоксичните ефекти, предизвикани от изследваните вещества (Таблица 3). Чрез стойностите на  $CC_{50}$  може да бъде изчислен PIF факторът (Photo-irritancy factor) за всяко едно изследвано вещество, по следната формула:  $PIF = \text{Цитотоксичност } CC_{50} / \text{Фототоксичност } CC_{50}$ .

PIF факторът е показателен за това, дали едно вещество е фототоксично или не. Освен това чрез PIF факторът може да се сравни фототоксичността на различни вещества, тествани при различни клетъчни линии. Както се вижда от таблицата PIF факторът може да бъде различен за едно и също вещество, тествано върху различни клетъчни линии. Това е така защото клетъчните линии имат различна чувствителност към дадено фототоксично вещество. Обобщените данни в Таблица 3 имат добро съответствие с литературните данни за фототоксичността на изследваните вещества. PIF факторът за масло от здравец е близо до единица и при трите клетъчни линии, което е характерно за нефототоксичните вещества. Останалите две вещества оказват по-силен фототоксичен ефект върху мишата клетъчна линия BALB/3T3 в сравнение с човешките клетъчни линии MCF10A и ВJ.

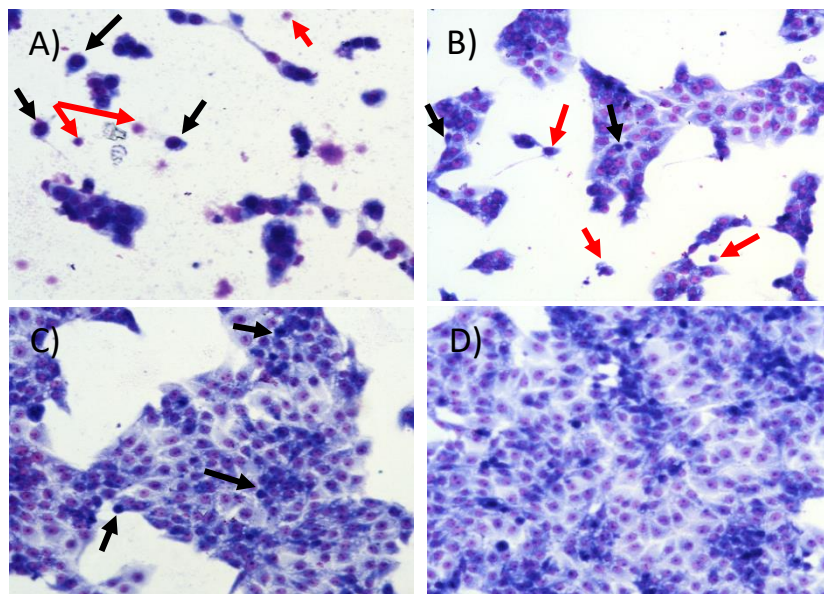
Таблица 3. Стойности на  $CC_{50}$  и PIF – фактор.

Клетъчни линии	Вещества	$CC_{50} \pm SD$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		PIF*
		Цитотоксичност	фототоксичност	
BALB/3T3	Акридин оранж	$5.51 \pm 0.33$	$0.14 \pm 0.06$	<b>39.36</b>
	Радахлорин	$220.8 \pm 16.21$	$29.79 \pm 1.43$	<b>7.41</b>
	Масло от здравец	$91.54 \pm 1.1$	$91.4 \pm 1.43$	<b>1</b>
MCF-10A	Акридин оранж	$6.16 \pm 0.24$	$0.28 \pm 0.02$	<b>22</b>
	Радахлорин	$418.2 \pm 11.8$	$93.09 \pm 2.18$	<b>4.5</b>
	Масло от здравец	$87.62 \pm 2.16$	$90.27 \pm 1.3$	<b>0.97</b>
ВJ	Акридин оранж	$9.51 \pm 0.31$	$0.56 \pm 0.03$	<b>16.98</b>
	Радахлорин	$346.6 \pm 10.7$	$136.5 \pm 10.48$	<b>2.54</b>
	Масло от здравец	$86.03 \pm 2.97$	$74.31 \pm 4.44$	<b>1.16</b>

\* PIF (Photo-irritancy factor),  $PIF < 2$  не фототоксично,  $PIF \geq 2$  и  $< 5$  вероятна фототоксичност,  $PIF \geq 5$  фототоксично.

### 1.3. Морфологичен анализ

За по-детайлно проучване, влиянието на излъчената светлина от слънчевия симулатор върху клетките BALB/3T3 клон А31, третирани с акридин оранж, използвахме двуетапно оцветяване с Май-Грюнвалт Гимза (Фигура 7). При това изследване проследихме морфологичните промени при клетки, третирани с различни концентрации на фототоксичното вещество (FC<sub>90</sub>, FC<sub>70</sub> и FC<sub>50</sub>). Микроскопското наблюдение показва, че при FC<sub>90</sub> се наблюдават множество малки клетъчни фрагменти, които са получени като краен резултат от процеса апоптоза (червени стрелки, Фигура 7, А). Наблюдават се и няколко все още живи клетки в напреднал стадии на апоптоза (черни стрелки). При концентрация FC<sub>70</sub> (Фигура 7, В) се наблюдава разкъсване на клетъчния слой. Голяма част от клетките са мъртви и с нарушени адхезивни свойства, в резултат на което са отмити от повърхността на ямката, при изпълнение на протокола за оцветяване. Наблюдават се клетки в ранен (черни стрелки) и късен (червени стрелки) стадии на апоптоза. При концентрация FC<sub>50</sub> наблюдаваме множество закръглени клетки, означени с черни стрелки (Фигура 7, С), които са в различни стадии на апоптоза, както и клетки с нормална морфология. При контролата (Фигура 7, D) наблюдаваме клетки с нормална морфология, изграждащи напълно конфлуентен монослой. Наличието на мъртви и апоптични клетки при различните изследвани концентрации на акридин оранж, корелира с резултатите получени от тестовете за определяне на фототоксичност, описани по-горе.

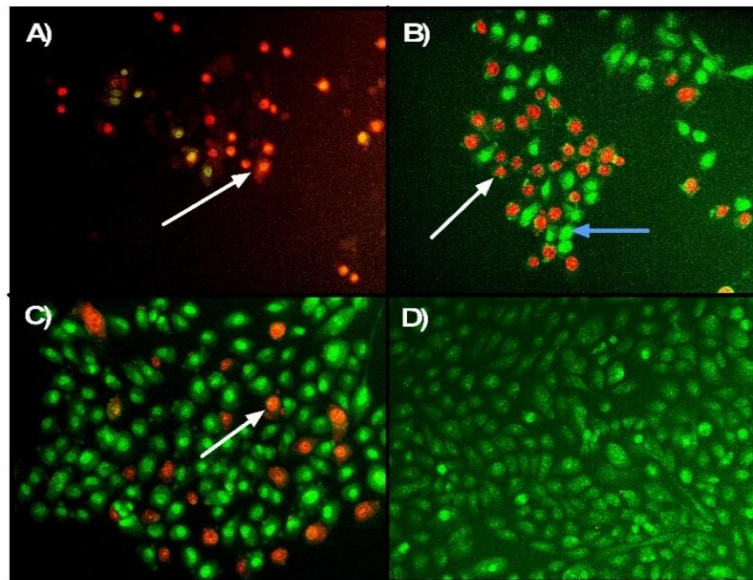


Фигура 7. Цитохимичен анализ на клетъчна култура BALB/3T3 клон А31, третирана с акридин оранж в концентрации: А) FC<sub>90</sub>, В) FC<sub>50</sub>, С) FC<sub>10</sub> и D) Негативна контрола (не третирани клетки). Клетъчната култура е осветена за 10 минути със слънчевият симулатор. Оцветяване Май-Грюнвалт Гимза.

За по-точно определяне процесите на апоптоза и клетъчна смърт, настъпили в резултат на третиране с акридин оранж и последващо осветяване със слънчевия симулатор, използвахме флуоресцентна микроскопия. Клетките бяха визуализирани чрез двойно флуорохромиране с Акридин оранж и Пропидиев йодит (Фигура 8). Чрез тази методика могат да бъдат оценени различните стадии на апоптоза (клетки със светлозелени фрагментирани ядра – начален стадий на апоптоза, клетки с оранжево-червени ядра – напреднал стадий на апоптоза, клетки с

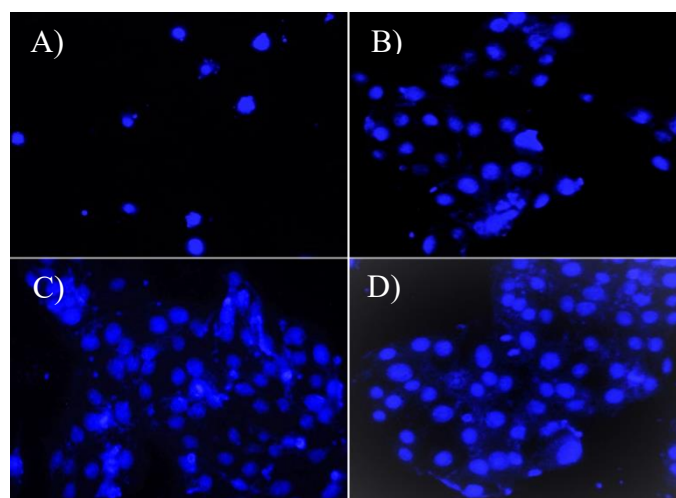


кондензирани тъмно-червени ядра – краен стадий на апоптоза). При концентрация на акридин оранж  $FC_{90}$  (Фигура 8, А) наблюдаваме множество малки тъмночервени фрагменти от клетъчни ядра (бяла стрелка) и няколко зелени клетки в начален стадий на апоптоза. При  $FC_{50}$  (Фигура 8, В) наблюдаваме клетки в начален и напреднал стадий на апоптоза (синя и бяла стрелка съответно). При  $FC_{10}$  (Фигура 8, С) се наблюдават апоптични клетки и клетки с нормална морфология и равномерно зелено оцветяване характерно за неувредените клетки.



Фигура 8. Флуоресцентен анализ на клетъчна култура BALB/3T3, третирана с акридин оранж в концентрации: А)  $FC_{90}$ , В)  $FC_{50}$ , С)  $FC_{10}$  и D) Негативна контрола. Клетъчната култура е осветена за 10 минути със слънчевият симулатор. Двойно флуорохромиране с АО/PI.

Освен това бе изследвана и морфологията на ядрата чрез флуоресцентна микроскопия и оцветяване с DAPI (фигура 9). Резултатите показва, че след 72 часа инкубиране на клетки с акридин оранж и последващо облъчване, при 30-40% от клетките се наблюдава кондензация и фрагментация на ядрата, което е показател за наличие на апоптоза.



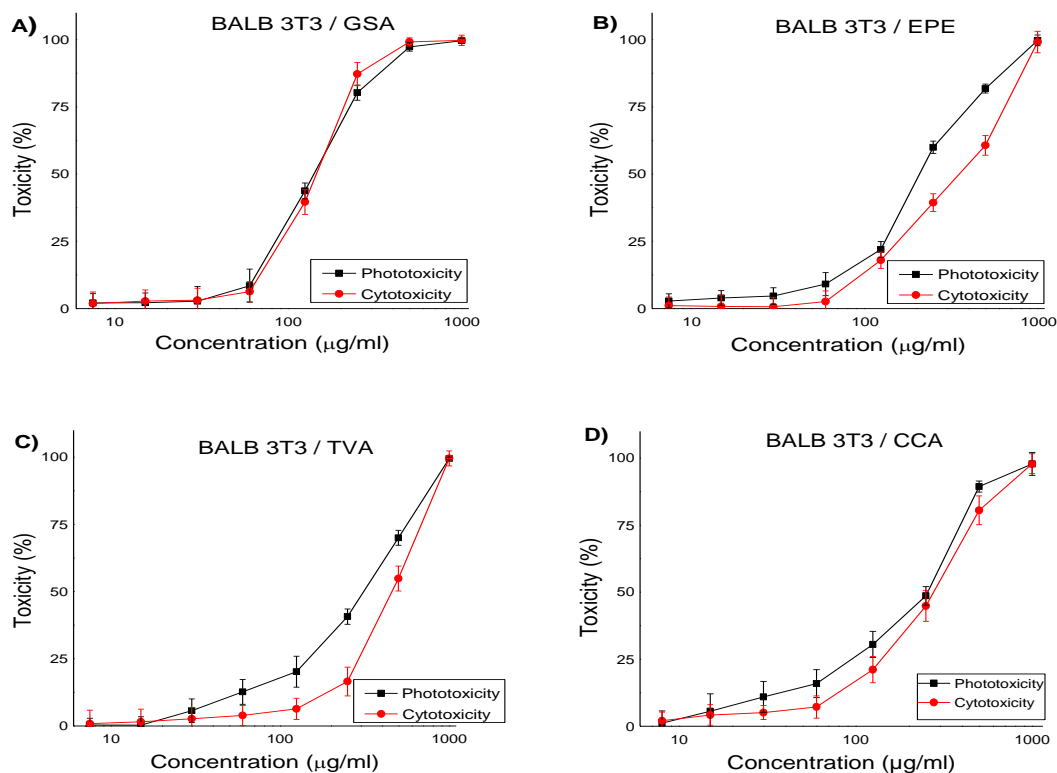
Фигура 9. Флуоресцентен анализ на клетъчна култура BALB/3T3, третирана с акридин оранж в концентрации: А)  $FC_{90}$ , В)  $FC_{50}$ , С)  $FC_{10}$  и D) Негативна контрола. Клетъчната култура е осветена за 10 минути със слънчевият симулатор. Оцветяване с DAPI.

#### 1.4. Изследване за фототоксичност на природни продукти

Основната цел на настоящата дисертация е валидиране на симулатор на слънчева светлина за изследване на съединения от различен произход за фототоксичност. То включва провеждане на *in vitro* експерименти върху добре охарактеризирани вещества спрямо техния фототоксичен профил за адаптиране на светлинният източник към стандартния протокол за изследване на фототоксичност. Освен това решихме да направим серия от експерименти за да докажем ефективността и практическото приложение на слънчевия симулатор в изследването за фототоксичност на природни продукти (растителни екстракти).

Медицинските растения намират широко приложение в ежедневието на хората. Според доклади на Световната Здравна Организация около 80% от населението, живеещо в развиващите се страни използва билкови лекарства, като алтернативна и/или допълваща терапия [1]. България има хилядолетна история за използване на билки при лечение на различни заболявания. Близо 50% от лекарствата на пазара са направени от медицински растения. Универсалната роля на растенията в лечението на различни заболявания се илюстрира от тяхното използване във всички основни направления в медицината [2, 3]. С времето интересът към тях остава засилен, тъй като много активни съставки на лечебни растения все още не могат да бъдат получени по синтетичен начин [4].

Има голям брой научни проучвания относно билковите лекарства, но за съжаление към настоящия момент, информацията за химичния състав на много растения е ограничена. Слабо проучена е и тяхната биологична активност и ниво на безопасност (цитотоксичност и фототоксичност). Известно е че някои растения съдържат химични съставки, които са фототоксични. Наличие на фототоксични съединения е установено при много семейства растения [5]. С оглед на това изследвахме за фототоксичност екстракти от *Epilobium parviflorum* Schreb (EPE), *Geranium sanguineum* L. (GSA), *Tanacetum vulgare* L. (TVA), и *Cotinus coggygria* Scop. (CCA), получени чрез екстракция с различни органични разтворители. Експериментите бяха проведени съгласно стандартния протокол за определяне на фототоксичност – BALB/3T3 Neutral Red Uptake тест. Екстрактите са изследвани върху клетъчната линия BALB/3T3 клон А31 – миши ембрионални фибробласти. Третирането на клетките с изследваните вещества беше извършено при концентрации от 7.5 до 1000  $\mu\text{g/ml}$  с последващо облъчване с LED слънчев симулатор за 10 минути. За негативна контрола използвахме третирани клетки със съответните екстракти, но необлъчени (поставени на тъмно). Резултатите от тези експерименти за определяне на фото- / цитотоксичност са обработени математически, статистически и са построени съответните графики (фигура 10). Ефектите, предизвикани от изследваните екстракти, са от дозозависим тип, поради което са представени под формата на сигмоидални криви „доза-отговор“. За по-точно количествено определяне на разликата между кривите описващи цитотоксичността и фототоксичността използвахме средните стойности на  $CC_{50}$ , определени при три независими експеримента,  $n = 6$ . Стойностите на  $CC_{50}$  са показателни за силата на наблюдавания ефект. Като показател за фототоксичност се използва PIF-фактор (Photo-irritancy factor), който е съотношение между  $CC_{50}$  стойностите, определени при експериментите за цитотоксичност и фототоксичност (таблица 4).



Фигура 10. Фото- и цитотоксичност, определени при клетъчната линия BALB/3T3 клон А31. А) *EPE*, В) *GSA*, С) *TVA* и D) *CCA*.

Според представените резултати при трите екстракта (*EPE*, *TVA*, *CCA*) наблюдаваме леко изместване на кривата, отразяваща фототоксичността в посока на по-ниските концентрации. Всъщност това явление се наблюдава при фототоксичните вещества, но с много по-голяма разлика по отношение на  $CC_{50}$  стойностите. Въпреки това, получените данни за PIF фактора и за трите екстракта ги определя, като нефототоксични ( $PIF < 2$ ). Кривите доза-отговор при *GSA* не показват значима разлика между цитотоксичност и фототоксичност.

Таблица 4. Стойности на  $CC_{50}$  и PIF – фактор

Клетъчна линия	Екстракти	$CC_{50} \pm SD$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		PIF*
		Цитотоксичност	Фототоксичност	
BALB 3T3	<i>EPE</i>	$375 \pm 11.71$	$217.4 \pm 2.4$	1.72
	<i>GSA</i>	$152.2 \pm 4.88$	$146 \pm 3.46$	1.04
	<i>TVA</i>	$470.1 \pm 12.57$	$329.5 \pm 9.4$	1.43
	<i>CCA</i>	$282.3 \pm 34.46$	$258.2 \pm 20$	1.09

\* PIF – фактор (Photo-irritancy factor).  $PIF < 2$  не фототоксично вещество,  $PIF \geq 2$  и  $< 5$  вероятна фототоксичност,  $PIF \geq 5$  фототоксично.

В таблица 4 е представено обобщение на получените след статистически анализ стойности на  $CC_{50}$  и стойностите на PIF фактора, който е определящ за фототоксичността на

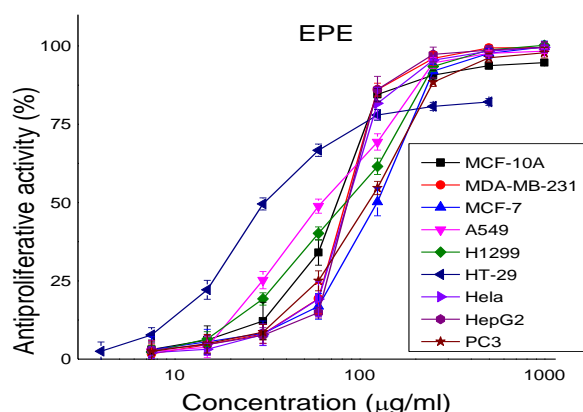
всеки от четирите екстракта. Най-високи стойности на PIF факторът бяха получени за *EPE* и *TVA*: 1.72 и 1.43 съответно. От литературните данни е известно, че растенията от семейство Asteraceae, към което се отнася видът *Tanacetum vulgare* L., в своя химичен състав имат две групи фотоактивни съединения, като полиацетилени и техните тиофенови производни [6]. Също така флавоноид – 2,3-дехидросилибин, който присъства в състава на различни екстракти, получени от природни продукти, се смята за съединение с фототоксичен потенциал [6]. Предполагаме че количеството на фоточувствителните съединения е незначително в изследваните екстракти, поради което те не могат да предизвикат фототоксичен отговор.

### 1.5. Изследване за потенциална антитуморна активност на природни продукти

Екстрактите (*GSA*, *EPE*, *TVA* и *CCA*) бяха тествани при *in vitro* условия за потенциална антипролиферативна / антитуморна активност. Туморните клетъчни линии, използвани като *in vitro* модел на онкологично заболяване в настоящия експеримент, са MDA-MB-231, MCF-7, A549, H1299, HT-29, HeLa, HepG2 и PC3. За модел на здрава тъкан използвахме клетъчната линия MCF-10A – човешки епителни клетки от млечна жлеза. Антипролиферативната активност е отчетена чрез МТТ тест за *EPE*, *GSA*, *TVA* и чрез NRU тест за *CCA*, след 72 h инкубация на клетките със съответните екстракти в различни концентрации от 7.5 до 1000 µg/ml. Изборът на теста за *CCA* с неутрално червено беше направен във връзка с това, че данните за химичния състав на прилагания екстракт показаха, че той съдържа вещества с изявиени редукионни свойства. Въпреки че клетките се промиват преди прилагането на багрилото, следи от екстракта, който е с ограничена разтворимост във вода, все пак могат да се задържат, което би довело до редукия на МТТ и оттам до получаване на фалшиви положителни резултати за преживяемостта. За да избегнем тази вероятност за етилацетатен екстракт от *Cotinus coggygria* Scop. предпочетохме NRU тест пред МТТ-теста.

Антипролиферативната активност на екстрактите е представена под формата на сигмоидална крива „доза-отговор“. Средните стойности на IC<sub>50</sub> (50% инхибирища пролиферацията концентрация) и техните стандартни отклонения (SD) са изчислени на базата на получените сигмоидални криви и са представени в Таблица 5.

Антипролиферативната активност на *EPE* (фигура 11) се дължи на различни активни фитосъединения, като танини, флавоноиди, полифенолни киселини, както и на кверцетин, мирицетин и мирицитрин. Поради антиоксидантните, антибактериални и противовъзпалителни ефекти на тези биологично активни съединения, *Epilobium parviflorum*, се използва като лекарство в традиционната медицина за лечение на заболявания на простатата, главно доброкачествена простатна хиперплазия (ДПХ), пикочния мехур и бъбречни нарушения [7, 8].



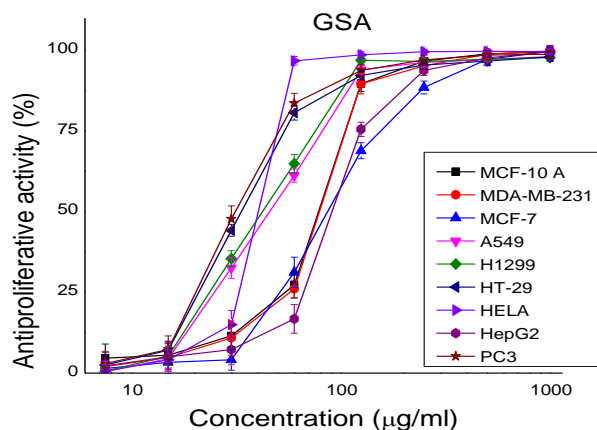
Фигура 11. Антипролиферативен ефект на *EPE* върху панел от клетъчни линии. Представените стойности са средноаритметично от три независими експеримента,  $n = 6$ ,  $\pm$  SD.

Анализът на антипролиферативната активност на *EPE* показва доста различни резултати при използваните клетъчни линии. Според литературните данни екстракти от *Epilobium parviflorum* подтискат пролиферацията на клетки от рак на простата, чрез инхибиране на ензимите на ароматаза и 5-алфа редуктаза [9]. Получените резултати показват подобен ефект при клетъчната линия PC3 (рак на простатата) със стойност на  $IC_{50} = 115.2 \pm 1.1 \mu\text{g/ml}$ .

Получените стойности на  $IC_{50}$  за клетъчните линии MDA-MB-231, H1299, HeLa и HepG2 не показаха статистически значима разлика ( $p < 0.001$ ) спрямо контролната нетуморогенна клетъчната линия MCF-10A. Добре изразен е наблюдаваният антипролиферативен ефект върху клетъчната линия HT-29 (колоректален карцином)  $IC_{50} = 31.21 \pm 2.1 \mu\text{g/ml}$ . Тези резултати са близки с резултатите, получени от Akbudak et. al. 2020 [10] за екстрактите от *E. Parviflorum*, които имат потенциал за приложение, при превенцията на колоректален карцином.

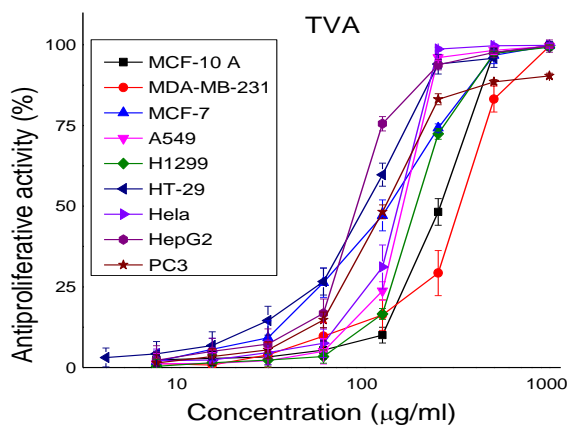
Екстрактите, получени от *Geranium sanguineum* L., са богати на полифенолни комплекси, съдържат флавоноиди (0,172%), танини (16,15%) и катехини (2,91%) [11]. Фармакологичните ефекти на тези природни вещества, включително антитуморна, антиоксидантна и антимикробна активност, се дължат на високото съдържание на танини [12].

Според получените резултати представени на Фигура 12, екстрактът *GSA* прояви висока антипролиферативна активност в по-ниски концентрации, при клетъчните линии HT-29 ( $IC_{50} = 34.78 \pm 1.5 \mu\text{g/ml}$ ) и PC3 ( $IC_{50} = 32.16 \pm 2.6 \mu\text{g/ml}$ ). Също така висок цитотоксичен ефект се наблюдава и при клетъчните линии H1299 ( $IC_{50} = 44.93 \pm 1.4 \mu\text{g/ml}$ ) и HeLa ( $IC_{50} = 42.83 \pm 0.8 \mu\text{g/ml}$ ). Известно е че екстракти от *Geranium sanguineum* L. в българската народна медицина се използват, при стомашно-чревни заболявания и срещу инфекции и възпалителни състояния. Ye et al. 2007 показва при *in vitro* условия, че флавоноиди съдържащи се в билкови екстракти инхибират пролиферацията на туморни клетки, при рак на дебелото черво (HT-29), рак на простатата (DU-145) и рак на шийката на матка (HeLa) [13].



Фигура 12. Антипролиферативен ефект на *GSA* върху панел от клетъчните линии. Представените стойности са средноаритметично от три независими експеримента,  $n = 6, \pm SD$ .

Изследването на антипролиферативните ефекти на екстракти от *Tanacetum vulgare* L. върху човешки туморни клетъчни линии се ограничава до няколко проучвания. Литературните данни показват, че при *in vitro* условия е наблюдавана антитуморна активност на етанолови екстракти от вратига, при туморни клетъчни линии от рак на дебелото черво, рак на гърдата, рак на белите дробове, карцином на маточната шийка и левкемия [14-17]. Въпреки това, има вариации в докладваните антипролиферативни ефекти и стойности на  $IC_{50}$ , които могат да се обяснят с вътрешновидово разнообразие в химичния състав на растенията от различни географски райони. Настоящите резултати определят *in vitro* антипролиферативния потенциал на *TVA* (Фигура 13).

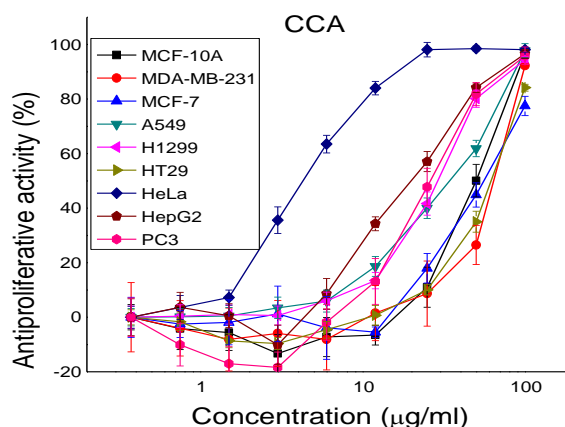


Фигура 13. Антипролиферативен ефект на *TVA* върху панел от клетъчните линии. Представените стойности са средноаритметично от три независими експеримента,  $n = 6, \pm SD$ .

*TVA* прояви слабо изразен антипролиферативен ефект в по-високи концентрации срещу нетуморогенната клетъчна линия MCF-10A ( $IC_{50} = 260.6 \pm 6.8 \mu\text{g/ml}$ ), което е показателно за ниско ниво на нежелани реакции и висока селективност. Спрямо туморните клетки, висока антипролиферативна активност бе наблюдавана при хормон-зависими ракови клетки MCF-7 ( $IC_{50} = 137.2 \pm 7.1 \mu\text{g/ml}$ ) и PC3 ( $IC_{50} = 131.4 \pm 6.9 \mu\text{g/ml}$ ). Тези резултати се обясняват с наличие на  $\beta$ -цитостерол в *TVA*, способен специфично да разпознава и взаимодейства с естрогеновите рацептори, като ги инхибира [18]. Резултатите показват, че екстрактът *TVA* ефективно инхибира

пролиферацията на клетъчната линия HT-29 (колоректален карцином) с концентрация  $IC_{50} = 106.1 \pm 6.5 \mu\text{g/ml}$ , която е повече от два пъти по-ниска от нетуморогенна клетъчна линия MCF-10A. Това показва, че екстрактът *TVA* има добра селективност спрямо HT-29. Тези резултати подкрепят резултатите, докладвани от изследователската група Ramírez-Erosa et al. 2007, която е установила че етаноловите екстракти на *Tanacetum vulgare* L. имат голяма перспектива за приложение, при терапия на рак на дебело черво [17].

Антипролиферативната активност на екстрактите, получени от *Cotinus coggygria* Scop. е слабо проучена и ограничена [19-22]. Сред активните съставки на растението, които притежават антинеопластични свойства са галовата киселина [23], флавоноидите: мирицетин [24], апигенин [25] и кверцетин [26].



Фигура 14. Антипролиферативен ефект на *CCA* върху панел от клетъчните линии.

Представените стойности са средноаритметично от три независими експеримента,  $n = 6, \pm SD$ .

Получените резултати (Фигура 14) показват, че екстрактът *CCA* е високо активен към клетъчната линия HeLa ( $IC_{50} = 4.53 \pm 0.36 \mu\text{g/ml}$ ). Тези резултати съответстват на получените резултати от Savikin et al. 2009 и Artun et al. 2016, които също отбелязват значително намаляване на клетъчната жизнестойност, при клетъчна линия от човешки карцином на маточната шийка, при третиране с екстракти, получени от *Cotinus coggygria* Scop. [22, 20]. Нашите резултати показват наличие на добра селективност спрямо нормалната клетъчна линия MCF-10A. Освен това наблюдавахме повишена антипролиферативна активност, при клетъчната линия HepG2.

Таблица 5. Средни  $IC_{50}$  стойности на екстракти *EPE*, *GSA*, *TVA* и *CCA*.

№	Клетъчни линии	$IC_{50} \pm SD (\mu\text{g/ml})$			
		<i>EPE</i>	<i>GSA</i>	<i>TVA</i>	<i>CCA</i>
1	MCF-10A	$80.43 \pm 1.43$	$83.56 \pm 1.19$	$260.6 \pm 6.8$	$50.79 \pm 4.65$
2	MDA-MB-231	$89.74 \pm 1.4$	$84.56 \pm 0.75$	$344.8 \pm 10.4$	$67.63 \pm 3.67$
3	MCF-7	$126.2 \pm 4.33$	$92.15 \pm 1.96$	$137.2 \pm 7.1$	$57.32 \pm 4.70$
4	A549	$64.57 \pm 5.54$	$48.3 \pm 1.79$	$170.3 \pm 2.58$	$36.25 \pm 3.47$
5	H1299	$90.16 \pm 6.5$	<b><math>44.93 \pm 1.4</math></b>	$199.9 \pm 3.4$	$30.32 \pm 2.48$
6	HT-29	<b><math>31.21 \pm 2.1</math></b>	<b><math>34.78 \pm 1.5</math></b>	$106.1 \pm 6.5$	$65.24 \pm 2.92$
7	HeLa	$92.06 \pm 4.9$	<b><math>42.83 \pm 0.8</math></b>	$159.4 \pm 9.3$	<b><math>4.53 \pm 0.36</math></b>
8	HepG2	$92.14 \pm 1.8$	$96.7 \pm 3$	$312.7 \pm 12.6$	<b><math>21.03 \pm 1.71</math></b>
9	PC3	$115.2 \pm 1.1$	<b><math>32.16 \pm 2.6</math></b>	$131.4 \pm 6.9$	$26.64 \pm 3.5$

В таблица 5 са представени обобщените резултати, получени след математическа и статистическа обработка. Дадени са стойностите на  $IC_{50}$  на всеки един изследван екстракт върху деветте клетъчни линии. Сравнително ниски инхибиторни концентрации, корелиращи с висок антипролиферативен ефект, бяха отчетени при екстрактите *EPE* и *GSA* върху клетъчната линия HT-29. Най-значителен резултат е получен при третиране с екстракт от *CCA* върху клетъчната линия HeLa. Тези резултати показват добър потенциал за разработване на нови противоракови препарати на основата на изследваните природни продукти.

Важен показател за ефективност на противораковите лекарства са токсичността и страничните ефекти, които могат да предизвикат тези субстанции върху здрава тъкан. Затова основният подход за определяне на тяхната приложимост се базира на оценка на противораковата активност на дадено съединение и сравняването на неговия ефект върху модел на здрава тъкан. Този подход е важен за определяне на селективността, като за количественото определяне се използва параметърът SI (Селективен Индекс) [27]. Селективният индекс представлява отношение между стойността на  $IC_{50}$  при нормалната клетъчна линия и  $IC_{50}$  стойността при туморната клетъчна линия. Високата стойност на  $SI > 2$  на дадено съединение предполага наличие на селективност. Съединения със стойност на  $SI < 2$  се счита, че могат да предизвикат обща токсичност и множество нежелани странични ефекти [28]. Изчислените стойности на SI за изследваните екстракти са представени в таблица 6.

Таблица 6. Селективни индекси на екстракти *EPE*, *GSA*, *TVA*, и *CCA*.

№	Клетъчни линии	Селективен индекс (SI)			
		<i>EPE</i>	<i>GSA</i>	<i>TVA</i>	<i>CCA</i>
1	MDA	0.9	1	0.76	0.75
2	MCF-7	0.6	0.9	1.9	0.89
3	A549	1.25	1.7	1.5	1.4
4	H1299	0.9	1.9	1.3	1.68
5	HT-29	<b>2.6</b>	<b>2.4</b>	<b>2.5</b>	0.78
6	HeLa	0.9	<b>2</b>	1.6	<b>11.2</b>
7	HepG2	0.8	0.86	0.8	<b>2.42</b>
8	PC3	0.7	<b>2.6</b>	<b>2</b>	1.91

Най-високия изчислен селективен индекс е при третиране с *EPE* върху клетъчната линия HT-29 ( $SI = 2.6$ ). В случая на третиране с *GSA* на клетъчните линии HeLa и PC3 стойностите на селективния индекс са  $SI > 2$ . При третиране на раковите клетките с *TVA* стойности на селективен индекс  $SI > 2$  са при клетъчните линии HT-29 и PC3. По отношение на клетъчната линия MDA-MB-231 се наблюдава  $SI < 1$  за всеки от изследвани екстракти.

Най-висока селективност като цяло прояви *CCA* спрямо клетъчната линия HeLa ( $SI = 11.2$ ). В сравнение с резултатите, получени от Artun et al., селективността на метаноловия екстракт спрямо HeLa е  $SI = 3.4$  или повече от три пъти разлика спрямо нашия резултат [20]. Следователно *CCA* има голям потенциал за бъдещи изследвания на неговата противоракова активност.

### 1.6. Изследване механизма на антитуморно действие на природни продукти

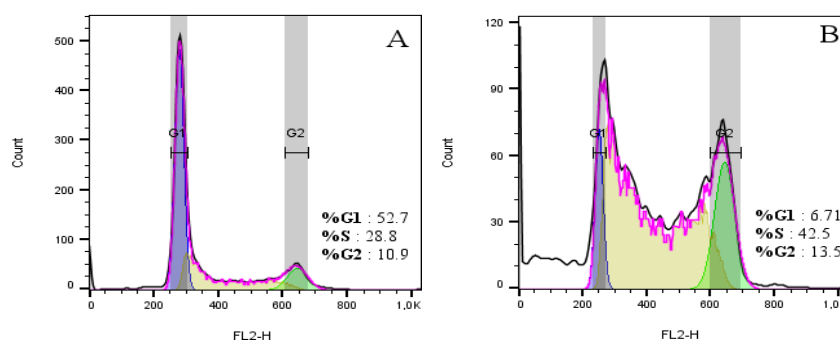
Въз основа на получените резултати от теста за антипролиферативна активност и селективност на екстракти *EPE*, *GSA*, *TVA* и *CCA* определихме клетъчните линии, при които да



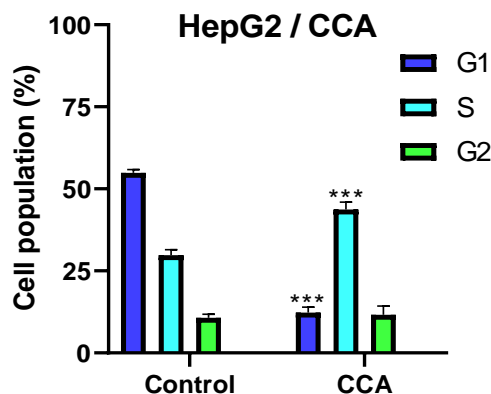
извършим по-детайлно изследване на биологичните механизми, водещи до инхибиране на пролиферацията и клетъчна смърт. За допълнително проучване избрахме екстрактите и клетъчните линии, при които се наблюдаваше селективен индекс  $> 2$ . За клетъчната линия HT-29 избрахме екстракти *EPE* със SI = 2.6, *GSA* със SI = 2.4 и *TVA* със SI = 2.5. За клетъчната линия HeLa използвахме екстракти *GSA* със SI = 2 и *CCA* със SI = 11.2. За HepG2 избрахме екстракт *CCA* със SI = 2.42 а при PC3 изследвахме екстракт *GSA* със SI = 2.6.

Влиянието, което оказват екстрактите върху фазите на клетъчния цикъл, беше изследвано чрез флоуцитометричен анализ по стандартен протокол. Клетките бяха третирани с концентрации на растителните екстракти, съответстващи на IC<sub>50</sub> стойностите, получени от предходните експерименти за определяне на антипролиферативен ефект.

За да установим как екстрактът *CCA* повлиява разпределението на клетките в различните фази на клетъчния цикъл, ние инкубирахме клетки HepG2 със *CCA* 21 µg/ml за 48 h. Проведените анализи показаха, че *CCA* спира клетъчния цикъл в S фазата (Фигура 15 и 16).



Фигура 15. Изследване на клетъчен цикъл след третиране със *CCA* за 48 часа, при клетъчната линия HepG2. А) не третирани клетки; В) клетки третирани с *CCA* 21 µg/ml. G1, S, G2, G2/M - фази на клетъчния цикъл.

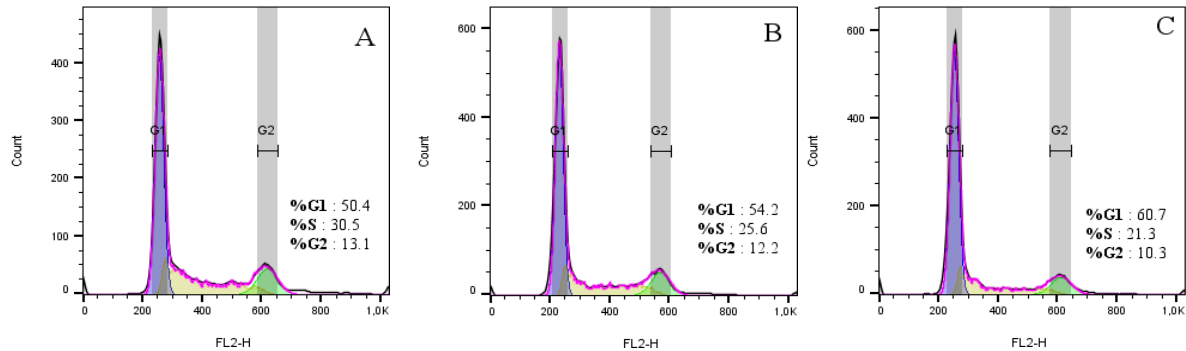


Фигура 16. Сравнение на клетъчните популации, при HepG2 разпределени в различни фази от клетъчния цикъл, след третиране с *CCA*. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

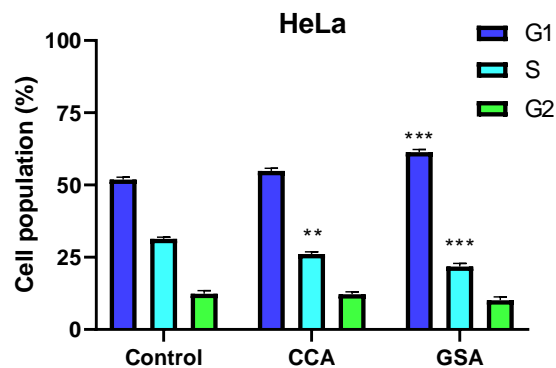
Полученият резултат потвърждава резултатите на Gospodinova et. al, 2021, които показват, че екстрактът от *C. Coggyria* Scop. причинява спиране в S фаза на клетъчния цикъл, при рак на гърдата (MCF-7) [29]. Това вероятно е свързано с активиране на S-фазния контролен пункт. Наблюдавано е, че екстракт от растението *Cotinus coggyria* Scop. има генотоксичен ефект върху чернодробни – и клетки от костен мозък, а също и върху туморни клетки [30]. Поради това предполагаме, че третирането със *CCA*, в съответните концентрации, вероятно води до

образуване на ДНК увреждания, при НерG2 клетките, с което се активира S-фазния контролен пункт.

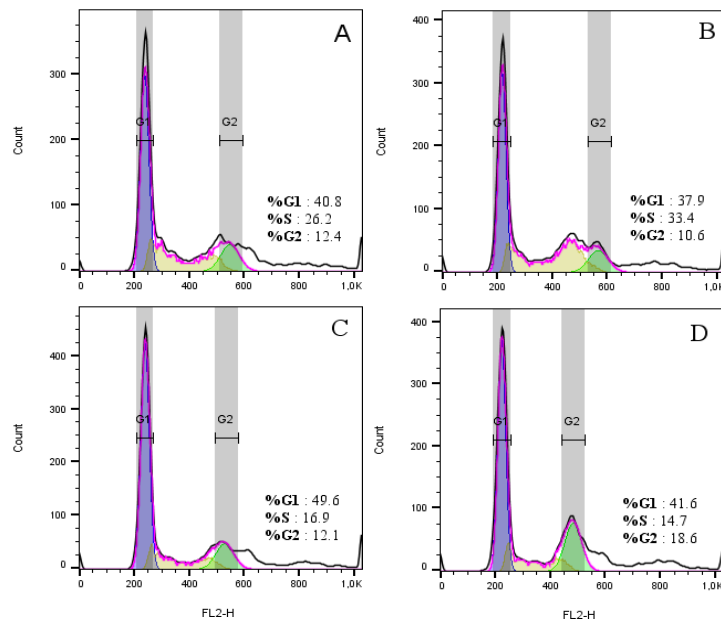
Вторият екстракт, който изследвахме е *GSA*. Влиянието му върху клетъчния цикъл е изследвано при рак на маточната шийка (HeLa) и колоректален аденокарцином (HT-29). Клетките бяха третирани с екстракта в концентрации 43  $\mu\text{g/ml}$  и 35  $\mu\text{g/ml}$  съответно. Резултатите показаха (Фигура 17 и 18), че *GSA* предизвиква леко натрупване на клетки в G1 – фаза (с около 10% повече от контролата).



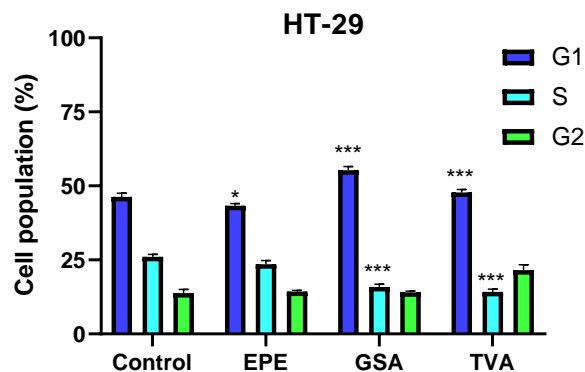
Фигура 17. Изследване на клетъчен цикъл след третиране на HeLa клетки с природни екстракти. А) Не третирани клетки, В) клетки третирани със *CCA*, С) клетки третирани с *GSA*. G1, S, G2, G2/M - фази на клетъчния цикъл.



Фигура 18. Сравнение на клетъчните популации, при клетъчната линия HeLa, разпределени в различни фази от клетъчния цикъл, след третиране с екстрактите *CCA* и *GSA*. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



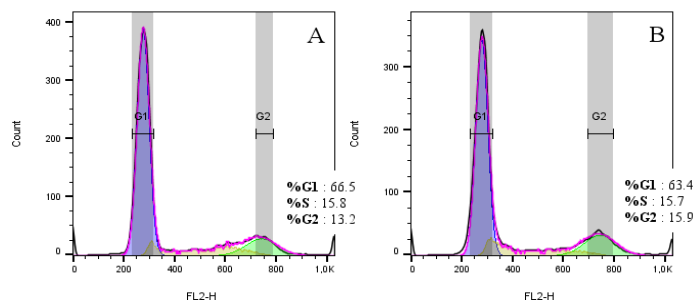
Фигура 19. Изследване на клетъчен цикъл след третиране с природни екстракти за 48 часа на клетъчната линия HT-29. А) Нетретирани клетки; В) Клетки третирани с *EPE*; С) Клетки третирани с *GSA*. D) Клетки третирани с *TVA*. G1, S, G2, G2/M - фази на клетъчния цикъл.



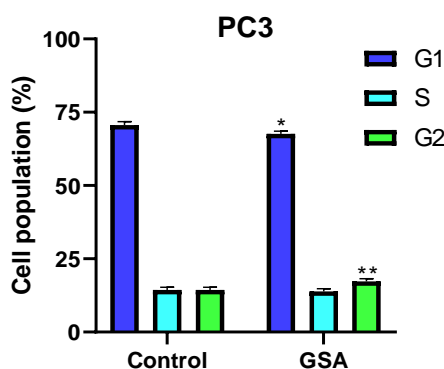
Фигура 20. Изследване на клетъчен цикъл след третиране с природни екстракти на клетъчната линия HT-29. G1, S, G2 - фази на клетъчния цикъл.

Тези резултати са сходни с описаните от Hana Lee et. al, 2009 [31], показващи G1 арест, съпроводен с натрупване на ДНК-повреди в клетки от рак на стомаха, третирани с екстракт от *Geranium*. Те показват, че активираният G1 арест е причинен от намаляването на експресията на CDK4/cyclinD1 и CDK2/cyclinE комплексите. Като цяло активирането на G1 контролния пункт е необходимо, за да се осигури цялостта на генома преди да премине през репликация. Пътят, по който се индуцира клетъчен арест, се определя от конкретната ДНК повреда, а самото поддържане на ареста силно зависи от активирането на p53 [32]. Последният има отношение и към активиране на про-апоптотични гени [33]. Оказва се също така че третирането с *Geranium thunbergii* води до увеличени нива на експресия на Вах протеина и съответно апоптоза [31], което корелира с получените от нас резултати от поточната цитометрия с Annexin-V/PI, както и с NRU анализа. Третирането на HeLa клетки с 4.5  $\mu\text{g/ml}$  *CCA* не показва съществена промяна в разпределението на клетките в отделните етапи на клетъчния цикъл. Също така не се наблюдава статистически значима промяна в процентното съотношение на раковите клетки в отделните

фази, при третиране на НТ-29 с *EPE*. За разлика от това третирането с *TVA*, доведе до намаляване на клетките в S-фаза, почти наполовина спрямо контролата.



Фигура 21. Изследване на клетъчен цикъл след третиране с *GSA* за 48 часа на клетъчната линия PC3. А) Нетретираните клетки, В) Клетки третирани с *GSA*. G1, S, G2, G2/M - фази на клетъчния цикъл.

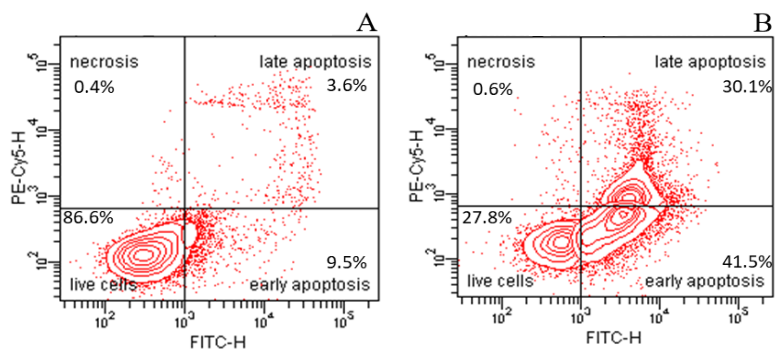


Фигура 22. Флоуцитометричен анализ на клетъчен цикъл, при PC3 клетки третирани с *GSA*. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

Третирането на PC3 клетки с *GSA* не показва значима разлика в разпределението на клетките в отделните фази на клетъчния цикъл (Фигура 21 и 22).

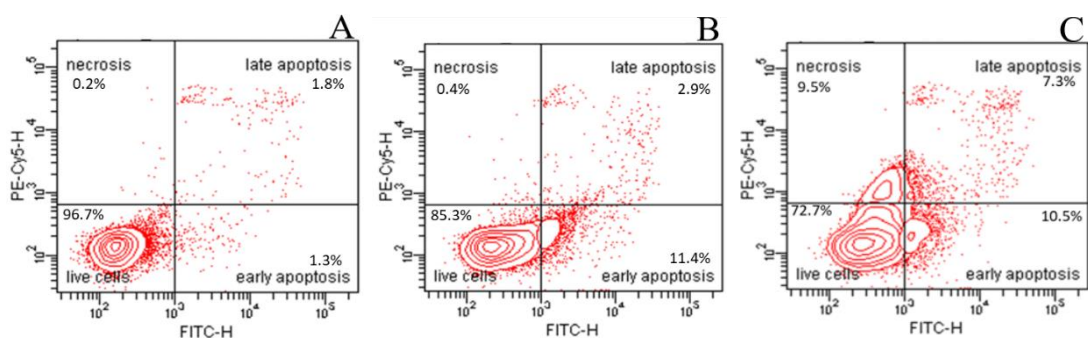
За количествено определяне на апоптоза (ранна и/или късна) и некроза при клетките, третирани с изследваните екстракти, проведохме FACS анализ, използвайки флуоресцентните маркери Анексин V-FITC/PI. Изследването бе извършено върху 4 туморни клетъчни линии (НТ-29, HeLa, НерG2 и PC3). Клетките бяха третирани с концентрации на растителните екстракти съответстващи на  $IC_{50}$  стойностите, получени от предходни експерименти.

Анализът за количествено определяне на апоптоза и некроза бе проведен върху клетъчна линия НерG2, след третиране с *CSA* в концентрация 21  $\mu\text{g/ml}$ . Получените резултати показаха че голяма част от нетретираните клетки са жизнеспособни и отрицателни за Анексин V-FITC и PI (86.6%). При третирането драстично се понижава преживяемостта на клетките спрямо контролата с високи проценти на клетки в ранна и късна апоптоза съответно 41.5% и 30% (Фигура 23 В).



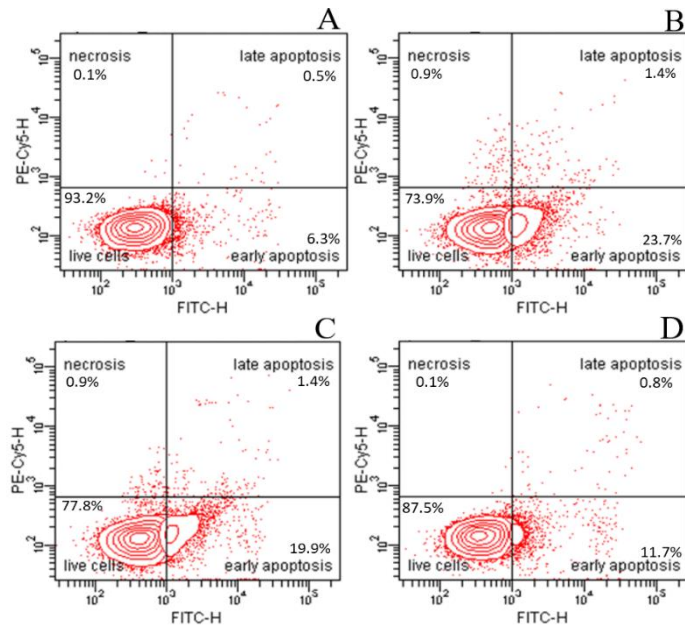
Фигура 23. Флоуцитометричен анализ на индуцирана клетъчна смърт след третиране със *CSA* за 24 часа, при клетъчната линия НерG2. А) Нетретираните клетки; В) Клетки третиране с 21 µg/ml *CCA*.

Втората клетъчна линия, която беше анализирана е HeLa (рак на маточната шийка). Оценката беше проведена след третиране с концентрации 4.5 µg/ml *CCA* и 43 µg/ml *GSA* за период от 24 часа. Бе установено че *CCA* предизвиква повишаване нивото на ранна апоптоза (11.4%) и леко повишаване на късната апоптоза (2.9%), с висок процент на преживелите клетки (85.3%). След третиране с *GSA* се наблюдава драстично увеличаване на апоптозата в сравнение с нетретираната проба.

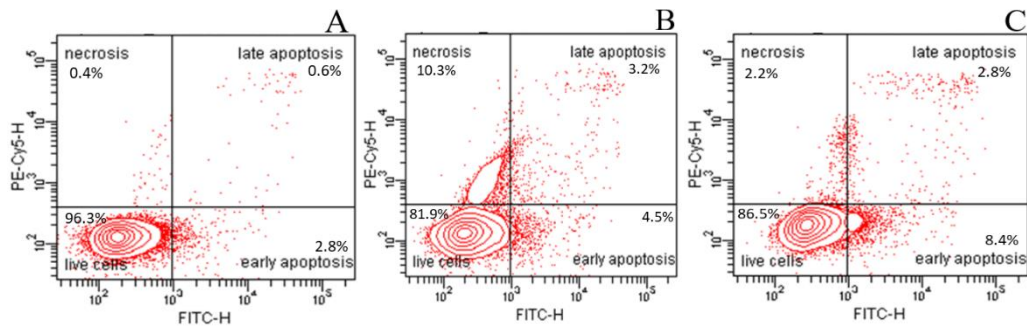


Фигура 24. Флоуцитометричен анализ на индуцирана клетъчна смърт след третиране с природни екстракти за 24 часа, при клетъчната линия HeLa. А) Нетретираните клетки; В) Клетки третиране със *CCA*, С) Клетки третиране с *GSA*.

Анализът при клетъчната линия HT-29 показва, че третирането с *EPE* предизвиква увеличаване на ранната апоптоза (23.7%) и леко завишаване на късната апоптоза (1.4%) и некротата (0.9%) в сравнение с нетретираната проба. При третиране с *GSA* се наблюдава същата тенденция спрямо нетретираните клетки. Сравнено с третираните клетки с *EPE*, процентът на живите клетки е по-висок (77.8%) за сметка на редуциране на ранната апоптоза (19.9%). Третирането с екстракт от *TVA* в най-малка степен повлиява апоптозата на клетките HT-29 в сравнение с негативната контрола, изразено в почти двойно увеличаване на процента клетки в ранна апоптоза (11.7%).



Фигура 25. Изследване на индуцирана клетъчна смърт, при клетъчната линия HT-29. А) Нетретираните клетки; В) Клетки третираните с *EPE*; С) Клетки третираните с *GSA*. D) Клетки третираните с *TVA*



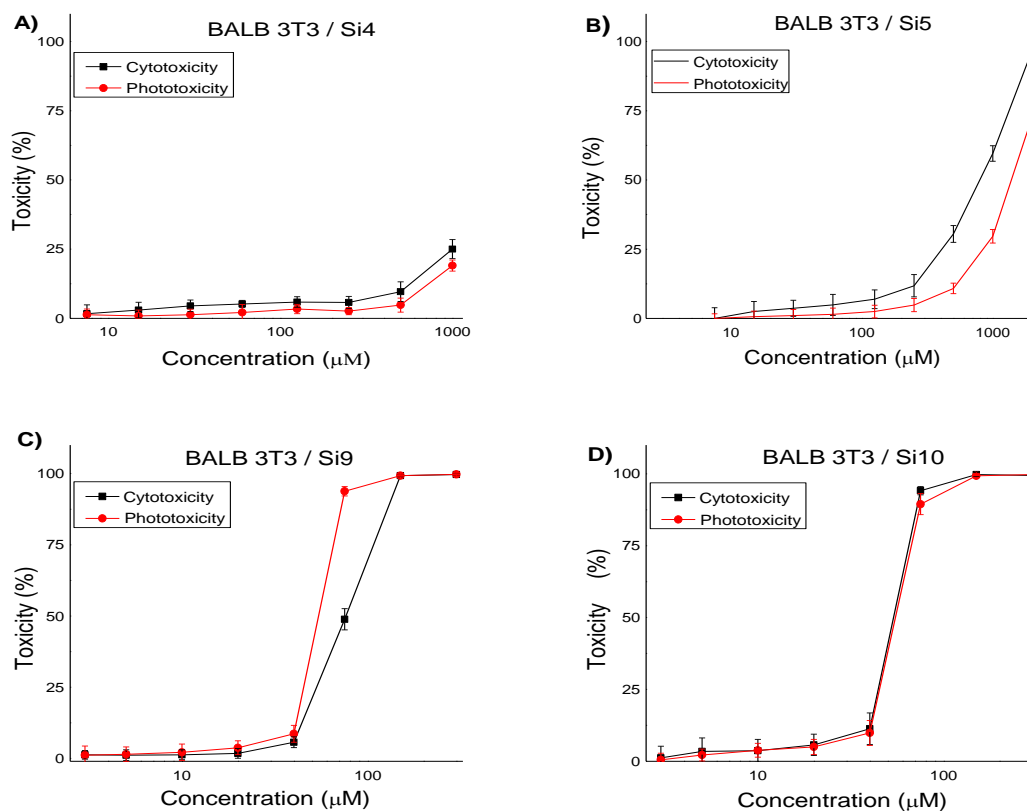
Фигура 26. Изследване на индуцирана клетъчна смърт, при клетъчната линия PC3 след третиране с екстракти за 24 часа. А) Нетретираните клетки; В) Клетки третираните с *GSA*. С) клетки третираните с *TVA*.

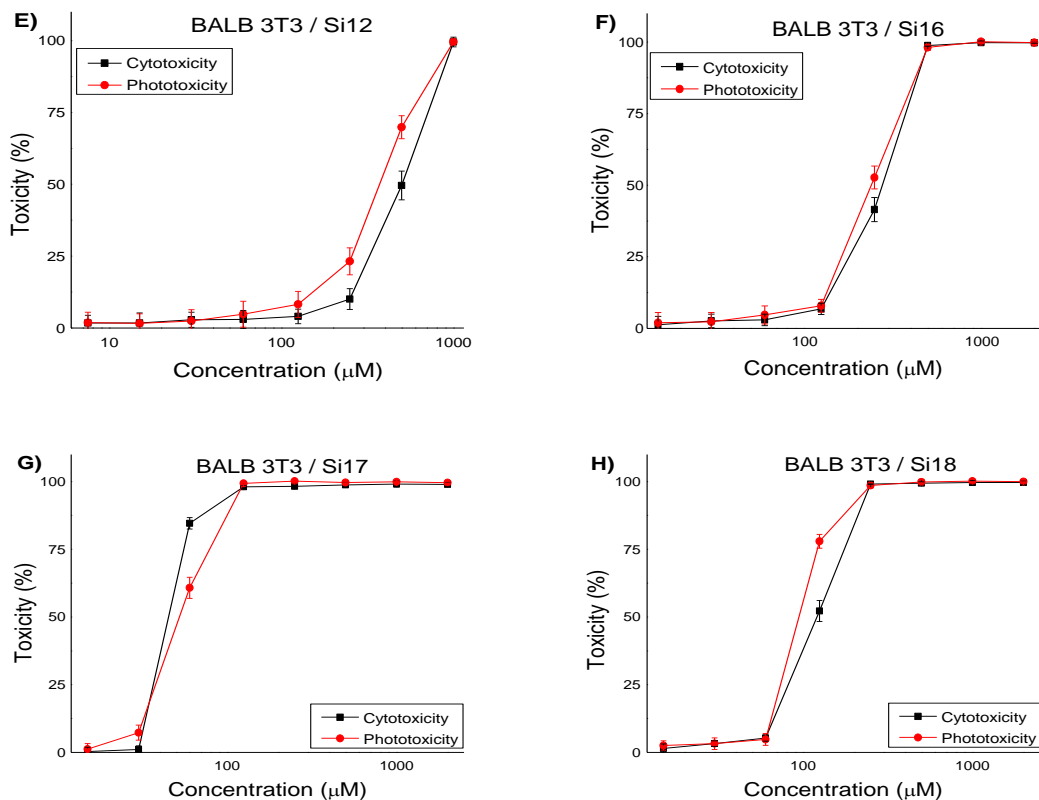
Третирането с *GSA* при клетъчна линия PC3 предизвиква повишаване процента на мъртвите клетки (10.3%), сравнено с нетретираните клетки. Третирането с *TVA* в по-малка степен води до повишаване процента на некротични клетки в сравнение с третиране с *GSA*, но процентът на клетките в ранен стадий на апоптоза е повишен (8.4%). Тези резултати показват, че третирането с *CCA* при клетъчните линии HepG2 и HeLa, води до индуциране на апоптоза. При третиране с *GSA* на клетъчните линии HeLa и PC3 получаваме обратен резултат, процентът на некротичните клетки е по-голям.

## 1.7. Тест за безопасност на новосинтезирани пептиди

В настоящата дисертация включихме тест за безопасност на новосинтезирани пептиди за да демонстрираме практическото приложение на валидирания слънчев симулатор и адаптирания *in vitro* 3T3 NRU тест за определяне на фототоксичност. Някои от известните антимикробни пептиди предизвикват голям интерес поради техните антитуморни свойства. Изследваните аналози на естествения антимикробен пептид (KLAKLAK)<sub>2</sub> са с обща структура (LysLeuXLysLeuXLys)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, където X е Ala или β-Ala, включително и техните конюгати с основна структура YLysLeuXLysLeuXLys-NH<sub>2</sub>, където X е Ala или β-Ala и Y е 1,8-нафталимид-Gly (NphtG) или кафеена киселина (Caf). Според литературните данни фармакофорите, които бяха използвани, сами по себе си са фоточувствителни съединения [34, 35]. За да установим дали тези съединения запазват своята фотоактивност, когато бъдат конюгирани с даден пептид, тествахме новосинтезираните пептиди за фототоксичност. Според регламентите на Световната здравна организация и Американската администрация на храните и лекарствата, веществата, които ще бъдат използвани, като терапевтични агенти, при лечение на туморни заболявания, задължително трябва да се тестват за фотобезопасност.

Изследването на пептидите за фотобезопасност беше извършено съгласно протоколите за безопасно приложение на изследваните вещества, чрез *in vitro* тестове, които включват определяне на цитотоксичност / фототоксичност с помощта на 3T3 NRU Assay. Реглементираната за тази цел клетъчна линия е BALB 3T3 клон A31 - ембрионални мишии фибробласти. Фототоксичността на изследваните пептиди бе определена при концентрации от 7.5 до 2000 μM с последващо облъчване с LED слънчев симулатор за 10 минути. Като негативна контрола използвахме третирани необлъчени клетки. Резултатите за фото- / цитотоксичност на пептидите са предствени под формата на сигмоидални криви „доза-отговор“ (фигура 27).





Фигура 27. Фото- и цитотоксичност, на пептиди: А) Si4, В) Si5, С) Si9, D) Si10, E) Si12, F) Si16, G) Si17 и H) Si18, определени при клетъчната линия BALB/3T3 клон А31.

Според представените резултати при Si9, Si12, Si16 и Si18 наблюдаваме леко изместване на кривата, отразяваща фототоксичността в посока към по-ниските концентрации. Всъщност това явление се наблюдава при фототоксичните вещества. Кривите „доза-отговор” при Si4 и Si10 не показват значима разлика между цитотоксичност и фототоксичност. При Si5 и Si17 наблюдаваме изместване на кривата, отразяваща фототоксичността към по-високите концентрации, което показва че тези вещества са светлочувствителни и лесно се разпадат при облъчване на нетоксични компоненти.

За по-точно количествено определяне на разликата между кривата за фототоксичност и кривата за цитотоксичност определихме стойностите на  $CC_{50}$ , които са показателни за силата на изследвания ефект и са представени в таблицата 7. Също така в нея е представен PIF факторът, който е показател за фототоксичност. При изследваните седем пептида той е по-малък от 2, което според класификацията на фототоксичните съединения ги определя като нефототоксични вещества. В случая на Si4 не можеше да бъде определен PIF фактор, защото стойностите на  $CC_{50}$  не могат да бъдат изчислени. Затова определихме MPE фактор, който е – 0.011. Според класификация на фототоксичните съединения спрямо MPE фактор, описано по-подробно в т 2.7. на раздел литературен обзор при Si4 той е по-малък от 0.1, което определя този пептид като нефототоксичен.

Като обобщение на теста за безопасност, приложен върху дадените пептиди, можем да кажем, че пептидът  $(KLAKLAK)_2-NH_2$  и неговите аналози и производни са с високо ниво на фотобезопасност и могат да бъдат извършени по-нататъшни експерименти за установяване на



техните биологични активности (антибактериална, антитуморна, антиоксидантна активност, определяне на стабилност при различни условия и др.).

Таблица 7. Стойности на  $CC_{50}$  и PIF – фактор на новосинтезирани пептиди.

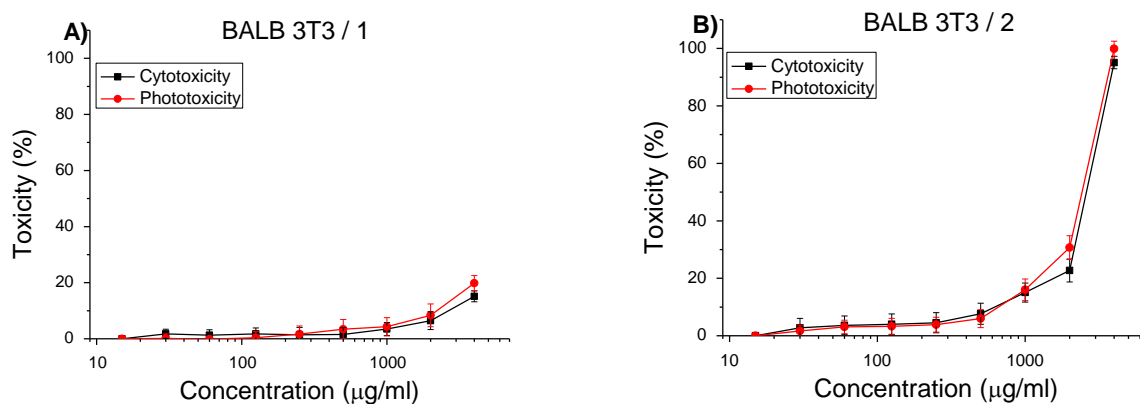
Клетъчна линия	Пептиди	$IC_{50} \pm SD$ ( $\mu M$ )		PIF*
		Цитотоксичност	Фототоксичност	
BALB 3T3	Si4	-	-	-
	Si5	$836.1 \pm 49.13$	$1475 \pm 24.35$	0.59
	Si9	$77.26 \pm 4.2$	$57 \pm 0.7$	1.36
	Si10	$56.4 \pm 1.5$	$57.7 \pm 1.7$	0.98
	Si12	$509.9 \pm 37.8$	$393.9 \pm 16.8$	1.29
	Si16	$284.3 \pm 16.68$	$244.8 \pm 12.7$	1.16
	Si17	$47.6 \pm 0.57$	$54.07 \pm 1.84$	0.85
	Si18	$123 \pm 6.17$	$100.3 \pm 1.74$	1.23

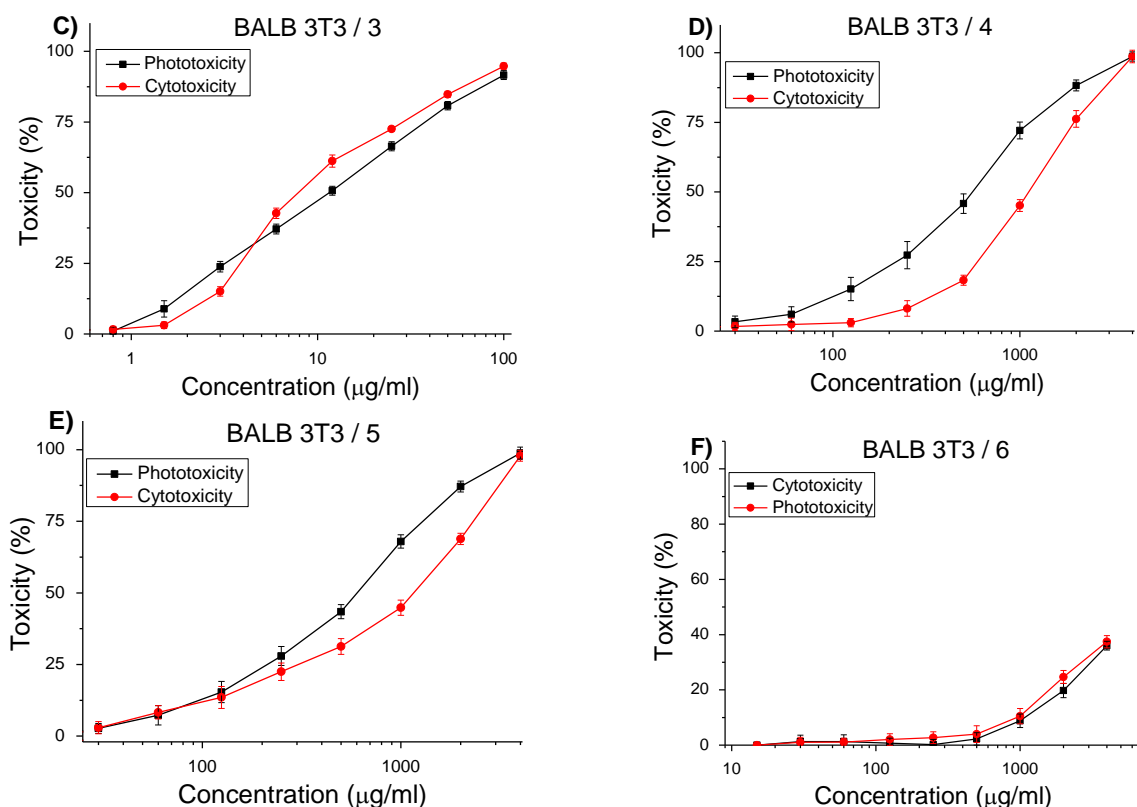
\* PIF (Photo-irritancy factor),  $PIF < 2$  не фототоксично,  $PIF \geq 2$  и  $< 5$  вероятна фототоксичност,  $PIF \geq 5$  фототоксично

### 1.8. Тест за безопасност на химично синтезирани съединения

Трета група от веществата, които бяха тествани за фототоксичност, са производни на тиенопиримидините. Тиенопиримидините са структурни аналози на биогенните пурини и се разглеждат, като потенциални антиметаболити. Техните производни са обещаващ клас синтетични съединения с много широк спектър от биологични свойства [36-38], по-специално антимикуробни [39, 40] и противотуморни [41, 42]. Оценката на фототоксичността на производните на тиенопиримидините ще послужи, като индикатор за фотостабилността на изследваните съединения, при облъчване със светлина и като доказателство, за тяхната безопасна употреба.

Новосинтезираните съединения бяха изследвани за фототоксичност по стандартен протокол (3T3 NRU-тест). Бяха тествани 6 новосинтезирани съединения с номенклатура: 1, 2, 3, 4, 5, 6. Определена е фототоксичността / цитотоксичността, изразена в % спрямо отрицателната контрола. Наблюдаваните ефекти са представени като сигмоидални криви доза-отговор (фигура 28).





Фигура 28. Фото- и цитотоксичност, на новосинтезирани съединения: А) 1, В) 2, С) 3, D) 4, E) 5, F) 6, определени при клетъчната линия BALB/3T3 клон А31

Според представените резултати при съединения 4 и 5 наблюдаваме леко изместване на кривата, отразяваща фототоксичността, в посока към по-ниските концентрации, което е характерно за фототоксичните вещества. Кривите доза-отговор при 1, 2, и 6 не показват значима разлика между цитотоксичност и фототоксичност. А при вещество 3 наблюдаваме изместване на кривата, отразяваща фототоксичността към по-високите концентрации, което показва, че след облъчване неговата токсичност намалява (таблица 8).

Таблица 8. Стойности на  $CC_{50}$  и PIF – фактор на новосинтезирани съединения.

Клетъчна линия	Вещества	$IC_{50} \pm SD$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		PIF*
		Цитотоксичност	Фототоксичност	
BALB 3T3	1	-	-	-
	2	$2754 \pm 64.3$	$2552 \pm 75.1$	1.08
	3	<b><math>8.37 \pm 0.6</math></b>	$11.85 \pm 0.8$	0.7
	4	$1155 \pm 57.8$	$578 \pm 58.7$	2
	5	$1212 \pm 103.3$	$632.3 \pm 35.6$	1.9
	6	-	-	-

\* PIF (Photo-irritancy factor), PIF < 2 не фототоксично, PIF  $\geq 2$  и < 5 вероятна фототоксичност, PIF  $\geq 5$  фототоксично

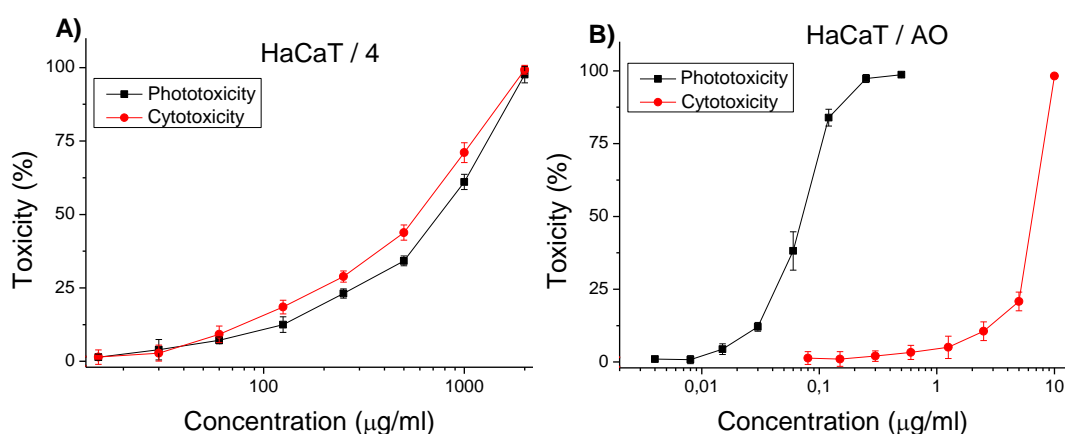
В таблица 8 са представени обобщените резултати за средните стойности на  $CC_{50} \pm SD$  и стойностите на PIF фактора, който е показател за фототоксичността на дадено съединение. Най-висока стойност на PIF фактора е определена при вещества 4 и 5, около 2, което вероятно се

дължи на присъствие на бензилов остатък в тяхната структура. Според класификацията за фототоксичност, съединение 4 е вероятно фототоксично. Останалите вещества имат PIF фактор  $< 2$  и се смятат за нефототоксични. В случая на вещества 1 и 6 не можеше да бъде определен PIF фактор, защото стойностите на  $IC_{50}$  не могат да бъдат изчислени. Затова определихме MPE факторът, който е 0.004 и -0.0001 съответно. Според класификацията на фототоксичните съединения спрямо MPE факторът, при 1 и 6 той е по-малък от  $< 0.1$ , което определя двете вещества като нефототоксични.

Стандартът за *in vitro* оценка на фототоксичност, регламентиран от OECD – BALB/c 3T3 NRU тест за фототоксичност, се характеризира с висока възпроизводимост на резултатите. Използваната клетъчната линия BALB/c 3T3 за идентифициране на фототоксични съединения прави анализа много чувствителен [43]. Ето защо при вероятна фототоксичност на съединения ( $2 \leq PIF < 5$ ) предлагаме да бъде проведено допълнително изследване върху *in vitro* модела на човешка кожа. Кератиноцитите са най-подходящи в този случай тъй като те представляват основния тип клетки на епидермиса. През последните години няколко проучвания съобщават, че кератиноцити са били използвани за оценка на фототоксичност *in vitro* и са показали ефективни резултати при облъчване на изследваните вещества [44-49].

При изследване на производни на тиенопиримидините за фотобезопасност определихме че съединение с номенклатура 4 с PIF фактор 2 попада в категорията на вероятно фототоксични вещества. За да установим дали това съединение може да предизвика странични фототоксични реакции или е безопасно за приложение в терапията на туморни заболявания, проведохме допълнително проучване.

Потенциалът на фототоксичността беше определен като се използва клетъчна линия от човешки кератиноцити (HaCaT), на базата на модифициран 3T3 NRU тест за фототоксичност. Фототоксичността на изследваното съединение с номенклатура 4 (Ethyl 4-Amino-5-methyl-2-(4-nitrobenzyl) Thieno [2,3-d] Pyrimidine-6-carboxylate) бе определена след облъчване с LED слънчев симулатор за 10 минути. Като положителна контрола използвахме третиранни клетки с акридин оранж. Резултатите за фото- / цитотоксичност, са представени под формата на сигмоидални криви „доза-отговор“ (фигура 29).



Фигура 29. Фото- и цитотоксичност, на А) съединение с номенклатура 4, В) Акридин оранж, определени при клетъчната линия HaCaT

Според представените резултати кривата доза-отговор, отразяваща фототоксичността при съединение 4, не се различава статически от кривата описваща цитотоксичният ефект. При положителната контрола (акридин оранж) наблюдаваме силно изместване на кривата,

отразяваща фототоксичността, в посока към по-ниски концентрации, което се наблюдава при фототоксичните съединения.

Таблица 9. Стойности на  $CC_{50}$  и PIF – фактор

Клетъчна линия	Вещества	$IC_{50} \pm SD$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		PIF*
		Цитотоксичност	Фототоксичност	
HaCaT	4	$615 \pm 50.23$	$796 \pm 41.26$	0.77
	АО	$6.89 \pm 0.13$	$0.075 \pm 0.007$	91.87

\* PIF – фактор (Photo-irritancy factor).  $PIF < 2$  не фототоксично вещество,  $PIF \geq 2$  и  $< 5$  вероятна фототоксичност,  $PIF \geq 5$  фототоксично.

В таблица 9 е представено обобщение на получените след статистически анализ стойности на  $CC_{50}$  и стойностите на PIF фактора, според които съединение 4 е нефототоксично. Резултатите от това проучване показват, че стойността на PIF фактора при третиране със съединение 4 върху клетъчната линия HaCaT намалява с 2,5 пъти в сравнение с получената стойност при клетъчната линия BALB/c 3T3. Данните, получени за положителната контрола (акридин оранж), потвърждават достоверността на проведения експеримент. Докладите, направени от изследователската група на Fullove T. P и Yu H., сочат за успешно използване на клетъчната линия HaCaT за изследване на механизма на фотоувреждане на пиренови производни при облъчване [50]. Полученият резултат за фототоксичен потенциал на съединение 4 върху клетъчната линия HaCaT показва възможността за неговото безопасно приложение, при терапия на ракови заболявания.

### 1.9. Изследване за потенциална антигуморна активност на химично синтезирани съединения

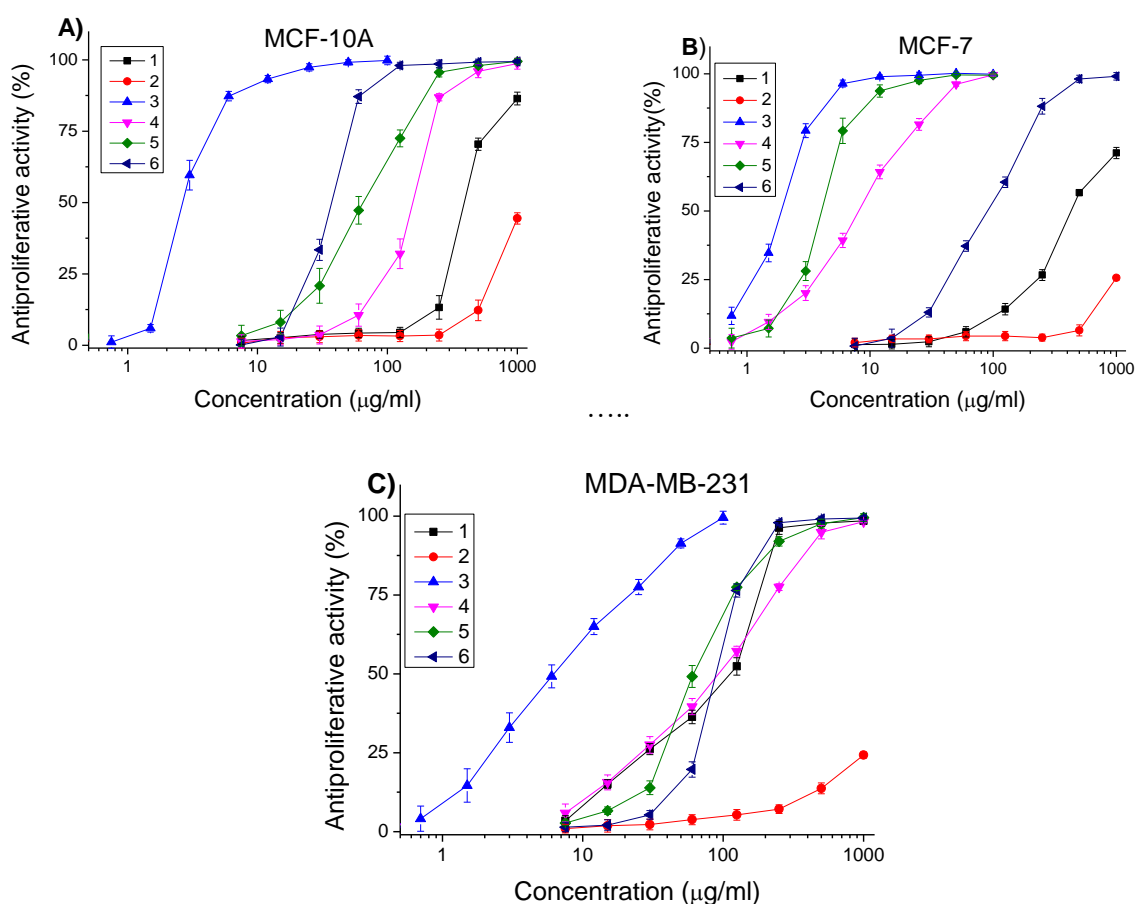
Производните на тиено[3,2-d]пиримидин напоследък се превърнаха във важен клас химиотерапевтични лекарства за лечение на туморни заболявания. Цитотоксичните ефекти на тези съединения се разкриват чрез различните им механизми на действие, включващи потискане на различни протеин кинази, чрез инхибиране на трансмембранните рецептори на растежни фактори [51, 52]. Свърхекспресията на протеин кинази обикновено се свързва с клетъчна пролиферация, което сигнализира появата на туморни образувания. Редица 4-амино-тиенопиримидинови аналози са показали инхибираща ефикасност спрямо B-Raf кинази. B-raf изоформите играят значителна роля в растежа и оцеляването на клетките, така че разработването на B-raf инхибитори може да се използва, като важен подход за противоракова терапия [53-55].

Членовете на Aurora киназата са потенциални терапевтични цели при рак, тъй като те имат митотична активност и стимулират оцеляването и пролиферацията на раковите клетки. Редица тиенопиримидинови производни са генерирани, като инхибитори на Aurora киназите [56].

Освен това учените са идентифицирали и EGFR инхибитори на базата на 4-амино-тиенопиримидини [57]. VEGF протеина и неговият рецептор (VEGFR) регулират васкулогенезата и ангиогенезата на кръвоносните съдове, при злокачествени образувания [58-61]. Разработено е голямо разнообразие от нови тиенопиримидинови производни, които са инхибитори на VEGFR. Извършените изследвания от Gryshchenko et. al 2015 за цитотоксичност на 4-амино-тиено [2,3-d]пиримидини, показва инхибиране на съдовия ендотелен растежен фактор (VEGF)/рецептор, съдържащ киназен домен (KDR) и рецептора на тромбоцитен растежен фактор (PDGF) [58].

Тъй като обсъжданите протеин кинази са терапевтични цели при лечението на туморни заболявания и въз основа на споменатите по-горе инхибиторни свойства на тиенопиримидините, в това проучване ние изследваме ново синтезирани етил 4-амино-5-метил-2-заместен-тиено [2,3-d]пиримидин-6-карбоксилати за потенциална анти туморна активност, при клетъчните линии от рак на гърдата (MDA-MB-231 и MCF-7).

Съединенията са изследвани за антипролиферативна активност чрез стандартен МТТ тест. *In vitro* култури от клетъчни линии MCF-10A, MCF-7 и MDA-MB-231 бяха инкубирани в продължение на 72 часа в присъствието на тестваните вещества в широк диапазон от концентрации. При MCF-10A и MDA-MB-231 съединение 3 е в диапазона от 0.5 до 100  $\mu\text{g/ml}$ , при всички останали вещества: от 4 до 1000  $\mu\text{g/ml}$ . MCF-7 клетъчна линия беше третирана с вещества: 3, 4 и 5 с концентрации: 0.5 до 100  $\mu\text{g/ml}$ , всички останали вещества бяха тествани с концентрации от 4 до 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Определената антипролиферативната активност е изразена в % спрямо отрицателната контрола. Получените резултати са показани на фигура 30.



Фигура 30. Антипролиферативен ефект на новосинтезирани съединения върху А) клетъчна линия MCF-10, В) клетъчна линия MCF-7 и С) клетъчна линия MDA-MB-231.

Средните стойности на  $\text{IC}_{50}$  бяха изчислени на всяко от шестте тествани съединения и са представени в Таблица 10. За да се определи анти туморната активност, като модел на здрава тъкан и контрола използвахме клетъчната линия MCF-10A (нетуморогенни човешки епителни клетки от млечната жлеза).

Таблица 10. Средни IC<sub>50</sub> стойности на новосинтезирани съединения върху туморни и нормална клетъчни линии.

Вещества	IC <sub>50</sub> ± SD (µg/ml)		
	Антипролиферативна активност	Антитуморна активност	
	MCF-10A	MCF-7	MDA-MB-231
1	410.9 ± 5.1	444.5 ± 9.2	116 ± 9.63
2	>1000	>1000	>1000
3	2.74 ± 0.13	<b>2.01 ± 0.07</b>	6.43 ± 0.95
4	165.4 ± 8.81	<b>8.58 ± 0.55</b>	98.25 ± 4.73
5	67.77 ± 9.1	<b>4.3 ± 0.11</b>	<b>18.28 ± 1.58</b>
6	39.23 ± 1.8	95.94 ± 3.49	94.94 ± 1.48

Както може да се види в Таблица 8, съединение 3, съдържащо три метокси групи, е най-цитотоксично спрямо BALB/ 3T3 със стойност на CC<sub>50</sub> = 8.37 µg/ml и в сравнение с всички тествани съединения проявява антипролиферативна активност срещу останалите клетъчни линии в най-ниски концентрации. Следователно свойствата на това съединение няма да бъдат разгледани подробно. Тиено [2,3-d]пиримидините 1 и 6 притежават най-ниска цитотоксичност, спрямо BALB 3T3 с CC<sub>50</sub> > 4000 µg/ml, последвано от съединение 2 с CC<sub>50</sub> = 2754 µg/ml.

По отношение на клетъчната линия MCF-7, най-добрият антипролиферативен ефект (с изключение на съединение 3) имат аминотиенопиримидини 5 и 4 който е около 16 пъти (съединение 5) и 20 пъти (съединение 4) по-висок в сравнение с антипролиферативният ефект наблюдаван при MCF-10A.

Ако се вземат предвид данните за антипролиферативната активност срещу MDA-MB-231, трябва да се посочи, че съединение 5 проявява най-висока антипролиферативната активност с IC<sub>50</sub> = 18.28 µg/ml. Стойностите на IC<sub>50</sub>, установени при третиране с MCF-10A, се използват за изчисляване на селективния индекс (SI), който оценява потенциала на дадено вещество да се използва, като противотуморно средство. Резултатите са представени в Таблица 11.

Таблица 11. Селективен индекс на тиенопиримидинови производни.

Вещества	Селективен индекс	
	MCF-7	MDA-MB-231
1	0.92	<b>3.54</b>
2	-	-
3	1.4	0.4
4	<b>19.3</b>	1.7
5	<b>15.8</b>	<b>3.7</b>
6	0.41	0.41

Най-високият селективен индекс по отношение на MCF-7 показват съединенията 4 (SI = 19.3) и 5 (SI = 15.8). Широко използвания в клиничната практика цитостатик Cisplatin (положителна контрола) показва SI = 2.36. По отношение на MDA-MB-231, тиенопиримидините 1 и 5 показват най-висок индекс (SI = 3.54 и 3.7 съответно). Изчисленият селективен индекс в положителната контрола (Cisplatin) е SI = 4. Високите нива на селективния индекс, както и силният антипролиферативен ефект на субстанции 4, и 5 изискват подробно изследване на механизма им на действие.

## V. ОБОБЩЕНИЕ

Резултатите показаха, че регистрираният спектър на излъчената светлина от слънчевия симулатор Helios-iO, модел LE-9ND55-H - 5500K има голямо сходство със спектъра на естествената слънчева светлина. Освен това мощността на излъчената светлина е напълно достатъчна за да предизвика фототоксична реакция при фоточувствителни съединения. Разпределението на плътността на мощността на 25 cm от центъра на диодната матрица е равномерно, като за двуизмерните размери на 96-ямякова плака за клетъчно култивиране мощността варира с не повече от 5%. Тези данни показват че този светлинен източник може да се използва, при тестове за фототоксичност, като се използват стандартни плаки за клетъчно култивиране.

Резултатите, получени от реални биологични експерименти при *in vitro* условия, доказват качествено пригодността и ефективността на тествания светлинен източник за извършване на тестове за фототоксичност. Нещо повече, наблюдаваният механизъм на клетъчна смърт (апоптоза и неспецифична некроза), при различни концентрации на фототоксичното вещество акридин оранж, напълно съответства на литературните данни. Всичко това показва една висока възпроизводимост на резултатите, описани в литературата за други, често използвани в практиката светлинни източници.

Резултати получени от експериментите за определяне на фототоксичност при *in vitro* условия върху природни продукти и новосинтезирани съединения демонстрират практическото приложение на валидирания източник. Освен това, наблюдаваните антипролиферативни ефекти, при някои от изследваните вещества, показват голям потенциал да бъдат приложени като терапевтични агенти при лечение на ракови заболявания с доказана фотобезопасност.

## VI. ИЗВОДИ

1. Определените физични характеристики: светлинен спектър, мощност и плътност на разпределение на мощността на тестваният слънчев симулатор (Helios-iO, модел LE-9ND55-H - 5500K) са сходни с естествената слънчева светлина. Поради това този светлинен източник е подходящ за извършване на тестове за фототоксичност.
2. Проведените биологични експерименти: *in vitro* тест за фототоксичност, светлинна и флуоресцентна микроскопия, ясно показват наличие на фототоксичен ефект, при клетките, третирани с Акридин оранж и Радахлорин. Това е пряко доказателство че тестваният слънчев симулатор е ефективен и подходящ за извършване на тестове за фототоксичност.
3. Тестовите за фототоксичност при вещества с природен и синтетичен произход демонстрират тяхната фотобезопасност и перспектива за приложение във фармацевтични и козметични продукти. Също така това показва практическото приложение на валидираният светлинен източник.
4. Получените резултати за антипролиферативната активност при етилацетатния екстракт изолиран от *Cotinus coggygia* Scop. показват висока селективност (SI = 11.2), при клетъчната линия HeLa, което е предпоставка за по-детайлното охарактеризиране и задълбочено изследване на този екстракт, като потенциален антитуморен агент.
5. Новосинтезираните съединения, производни на тиено[2,3-d]пиримидините 4 и 5, показват висока селективност SI = 19.3 и 15.8, съответно при клетъчната линия MCF-7. Тази висока селективност е съизмерима със селективността на терапевтици, рутинно прилагани, при лечение на туморни заболявания.

## VII. ОРИГИНАЛНИ ПРИНОСИ

1. Валидиран е LED – слънчев симулатор Helios-iO, модел LE-9ND55-H - 5500K, като светлинен източник, при *in vitro* тест за фототоксичност (*in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test). Определени са физическите характеристики на слънчевия симулатор, както и биологичните ефекти, които предизвиква, при облъчване на BALB 3T3 клетъчна култура, третирана с фототоксични вещества (акридин оранж и хлорин еб).
2. Слънчевият симулатор Helios-iO е успешно използван при тестове за безопасност на природни продукти и синтетични съединения (4 растителни екстракта и 14 синтетични вещества). При никоя от тестваните проби не бе наблюдаван фототоксичен ефект. Това позволява безопасна употреба на тестваните субстанции в областта на козметиката и фармацията.
3. При направения скрининг за антитуморна активност бяха идентифицирани няколко вещества с висока селективност (CCA, Ethyl 4-Amino-5-methyl-2-(4-nitrobenzyl) Thieno [2,3-d] Pyrimidine-6-carboxylate и Ethyl 4-Amino-2-benzyl-5-methyl-thieno[2,3-d]pyrimidine-6-carboxylate), което показва потенциал за приложение в терапията на онкологични заболявания с ниско ниво на странични ефекти.



## VIII. ИСПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

1. World Health Organization. WHO global report on traditional and complementary medicine. 2019; 5:226.
2. Sofowora A., Ogunbodede E., Onayade A. The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 2013, 10(5).
3. Gurib-Fakim A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 2006, 27(1): 1–93.
4. Dey Y. N., Ota S., Srikanth N., Jamal M., Wanjari M. A phytopharmacological review on an important medicinal plant - *Amorphophallus paeoniifolius*. *Ayu.*, 2012, 33(1): 27-32.
5. FU P. P., XIA Q., ZHAO Y., WANG S., YU H., CHIANG H. M. Phototoxicity of Herbal Plants and Herbal Products. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 2013, 31(3): 213–255.
6. Li X., An R., Liang K., Wang X., Phototoxicity of Traditional Chinese Medicine (TCM). *Toxicology Research*, 2018.
7. Steenkamp V., Gouws M., Gulumian M., Elgorashi E., Van J. Studies on antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant activity of herbal remedies used in the treatment of benign prostatic hyperplasia and prostatitis J. *Ethnopharmacol.*, 2006, 103(1): 71-75
8. Bajer T., Šilha D., Ventura K., Bajerová P. Composition and antimicrobial activity of the essential oil, distilled aromatic water and herbal infusion from *Epilobium parviflorum* Schreb. *Ind. Crop. Prod.*, 2017, 100: 95-105.
9. Vitalone A., Guizzetti M., Costa L., Tita G. Extracts of various species of *Epilobium* inhibit proliferation of human prostate cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2003, 55(5): 683–690.
10. Aydın Akbudak M., Sut T., Eruygur N., Akinci E. Antiproliferative effect of *Epilobium parviflorum* extracts on Colorectal Cancer Cell Line HT-29. *BIORXIV*, 2020.
11. Ivancheva S., Nikolova M., Tsvetkova R. Pharmacological activities and biologically active compounds of Bulgarian medicinal plants. *Research Signpost*, 2006, 37/661(2): 87-103.
12. Palamara A. T., Nencioni L., Aquilano K., et al. Inhibition of influenza A virus replication by resveratrol. *J Infect Dis.*, 2005, 191(10): 1719–1722.
13. Ye, C.L., Liu, Y., Wei, D.Z., 2007. Antioxidant and anticancer activity of 3'-formyl-4',6'-dihydroxy-2'-methoxy-5'-methylchalcone and (2S)-8-formyl-5-hydroxy-6-methylflavanone. *J. Pharm. Pharmacol.* 59, 553-559.
14. Devrnja N., Anđelković B., Arandžević S., Radulović S., Soković M., Krstić-Milošević D., Čalić D. Comparative studies on the antimicrobial and cytotoxic activities of *Tanacetum vulgare* L. essential oil and methanol extracts. *South African Journal of Botany*, 2017, 111: 212–221.
15. Wegiera M., Smolarz H., Jedruch H., Korczak M., Koproń K. Cytotoxic effect of some medicinal plants from Asteraceae family on J-45.01 leukemic cell line. *Acta Pol Pharm.*, 2012, 69(2): 263-268.
16. Gospodinova Z., Antov G., Angelova S., Krasteva P. In vitro antitumor potential of Bulgarian *Tanacetum vulgare* L. on human breast adenocarcinoma cells. *International Journal of Pharma Sciences.*, 2014, 4(2): 468-472.
17. Ramírez-Erosa I., Huang Y., Hickie R. A., Sutherland R. G., Barl B. Xanthatin and xanthinosin from the burs of *Xanthium strumarium* L. as potential anticancer agents. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2007, 85(11).
18. Hevesi T. B., Blazics B., Kéry Á. Polyphenol composition and antioxidant capacity of *Epilobium* species. *J Pharm Biomed Anal.*, 2009, 49(1): 26-31.

19. Antal D. S., Ardelean F., Pinzaru I. et al. Effects of cyclodextrin complexation on the anti-cancer effects of *Cotinus coggygria* extract and its constituents, butein and sulfuretin. *Revista de chimie.*, 2016, 67(8): 1618-1622.
20. Artun F. T., Karagoz A., Ozcan G. et al. In vitro anticancer and cytotoxic activities of some plant extracts on HeLa and Vero cell lines. *J BUON*, 2016, 21(3): 720-725.
21. Pollio A., Zarrelli A., Romanucci V. et al. Polyphenolic profile and targeted bioactivity of methanolic extracts from Mediterranean ethnomedicinal plants on human cancer cell lines. *Molecules*, 2016, 21(4): 395.
22. Savikin K., Zdunic G., Jankovic T. et al. In vitro cytotoxic and antioxidative activity of *Cornus mas* and *Cotinus coggygria*. *Nat Prod Res.*, 2009, 23(18): 1731-1739.
23. Kawada M., Ohno Y., Ri Y. et al. Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. *Anticancer Drugs*, 2001, 12: 847-852.
24. Zhang X., Ling Y., Yu H., Ji Y. Studies on mechanism of myricetin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG-2 cells. *Zhongguo Zazhi*, 2010, 35(8): 1046- 1050.
25. Ruela-de-Sousa R. R., Fuhler G. M., Blom N. et al. Cytotoxicity of apigenin on leukemia cell lines: implications for prevention and therapy. *Cell Death Dis*, 2010, 1: 19.
26. Duo J., Ying G. G., Wang G. W., Zhang L. Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation. *Mol Med Rep.*, 2012, 5(6): 1453- 1456.
27. Badisa R. B., Darling-Reed S. F., Joseph P., Cooperwood J. S., Latinwo L. M. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF7 cells. *Anticancer Res.*, 2009, 29: 2993-2996.
28. Awang N., Aziz Z. A., Kamaludin N. F., Chan K. M. Cytotoxicity and mode of cell death induced by Triphenyltin (IV) compounds in vitro. *J Biol Sci.*, 2014, 14: 84-93.
29. Gospodinova Z. I., Zupkó I., Bózsity N., Manova V. I., Georgieva M. S., Todinova S. J., Krasteva M. E. *Cotinus coggygria Scop.* induces cell cycle arrest, apoptosis, genotoxic effects, thermodynamic and epigenetic events in MCF7 breast cancer cells. *Zeitschrift Für Naturforschung*, 2021, 76(3-4): 129–140.
30. Matic S., Stanic S., Bogojevic D., Solujic S., Grdovic N., Vidakovic M., Mihailovic M. Genotoxic potential of *Cotinus coggygria Scop.* (Anacardiaceae) stem extract in vivo. *Genetics and Molecular Biology*, 2011, 34(2): 298–303.
31. Lee H., Kim W., Kang H. G., Kim W. J., Lee S. C., Kim, S. J. Geranium thunbergii extract-induced G1 phase cell cycle arrest and apoptosis in gastric cancer cells. *Animal Cells and Systems*, 2019: 1–8.
32. Kastan M. B., Onyekwere O., Sidransky D., Vogelstein B., Craig R. W. Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA Damage. *Cancer Research*, 1991, 51: 6304-6311
33. Pietsch E. C., Sykes S. M., McMahon S. B., Murphy M. E. The p53 family and programmed cell death. *Oncogene*, 2008, 27(50): 6507–6521.
34. Bonardi A. H., Zahouily S., Dietlin C., Graff B., Morlet-Savary F., Ibrahim-Ouali M., Lalevée J. New 1,8-Naphthalimide derivatives as photoinitiators for free-radical polymerization upon visible light. *Catalysts*, 2019, 9(8): 637.
35. Prasad N. R., Jeyanthimala K., Ramachandran S. Caffeic acid modulates ultraviolet radiation-B induced oxidative damage in human blood lymphocytes. *Journal of Photochemistry and Photobiology.*, 2009, 95(3): 196–203.
36. Mukherjee P., Sevrioukova H., Li I., Chreifi G., Martásek P., Roman L. J., Poulos T. L., Silverman R. B. Novel 2,4-disubstituted pyrimidines as potent, selective, and cell-permeable inhibitors of neuronal nitric oxide synthase, *J. Med. Chem.*, 2015, 58: 1067–1088.

37. Hafez H. N., Hussein H. A. R., El-Gazzar A. B. A., Synthesis of substituted thieno [2,3-d]pyrimidine-2,4-dithiones and their S-glycoside analogues as potential antiviral and antibacterial agents, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, 45: 4026–4034.
38. Hafez H. N., El-Gazzar A. B. A. Design and synthesis of 3-pyrazolyl-thiophene, thieno[2,3-d]pyrimidines as new bioactive and pharmacological activities, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, 18: 5222–5227.
39. Aly H. M., Saleh N. M., Elhady H. A. Design and synthesis of some new thiophene, thienopyrimidine and thienothiadiazine derivatives of antipyrene as potential antimicrobial agents, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, 46: 4566–4572.
40. Hafez H. N., El-Gazzar A. B. A., Zaki M. E. A., Simple approach to thieno[3,2-d]-pyrimidines as new scaffolds of antimicrobial activities, *Acta Pharm.*, 2016, 66: 331–351.
41. Zhu W. F., Zhai X., Li S., Cao Y., Gong P., Liu Y. J., Synthesis and cytotoxic activity of novel 2,6-disubstituted-4-morpholino-thieno[3,2-d]pyrimidines as potent anti-tumor agents, *Chin. Chem. Lett.*, 2012, 23: 703–706.
42. Liu Z., Wu S., Wang Y., Li R., Wang J., Wang L., Zhao Y., Gong P. Design, synthesis and biological evaluation of novel thieno[3,2-d]pyrimidine derivatives possessing diaryl semicarbazone scaffolds as potent antitumor agents, *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, 87: 782–793.
43. Vohr HW., Blumel J., Blotz A. et al. An intra-laboratory validation of the Integrated Model for the Differentiation of Skin Reactions (IMDS): discrimination between (photo)allergic and (photo)irritant skin reactions in mice. *Arch Toxicol.*, 2000, 73: 501–509.
44. Maciel B., Moreira P., Carmo H. et al. Implementation of an in vitro methodology for phototoxicity evaluation in a human keratinocyte cell line. *Toxicol in Vitro.*, 2019, 61: 104618.
45. Rajnochova' A, Za'le'sa'k Svobodova' B, Biedermann D, et al. Phototoxic potential of silymarin and its bioactive components. *J Photochem Photobiol B.*, 2016, 156: 61–68.
46. Rajnochova' Svobodova' A, Ulrichova' J, Vosta'lova' J. Human keratinocyte cell line as a suitable alternative model for in vitro phototoxicity testing. *An Bras Dermatol.*, 2019, 94: 105–106.
47. Xiong L, Tang J, Li Y, Li L. Phototoxic risk assessment on benzophenone UV filters: in vitro assessment and a theoretical model. *Toxicol In Vitro*, 2019, 60: 180–186.
48. Morliere P., Haigle J., Aissani K. et al. An insight into the mechanisms of the phototoxic response induced by cyamemazine in cultured fibroblasts and keratinocytes. *Photochem Photobiol.*, 2004, 79: 163–171.
49. Wang C. C., Xia Q., Li M. et al. Metabolic activation of pyrrolizidine alkaloids leading to phototoxicity and photogenotoxicity in human HaCaT keratinocytes. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.*, 2014, 32: 362–384.
50. Fullove T. P., Yu H. DNA damage and repair of human skin keratinocytes concurrently exposed to pyrene derivatives and UVA light. *Toxicol Res.*, 2013, 2: 193–199.
51. Ni Y., Gopalsamy A., Cole D., Hu Y., Denny R., Ipek M., Liu J., Lee J., Hall J. P., Luong M., Telliez J. B., Lin L. L. Identification and SAR of a new series of thieno[3,2-d]pyrimidines as Tpl2 kinase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, 21: 5952–5956;
52. Heffron T. P., Berry M., Castaneda G., Chang C., Chuckowree I., Dotson J., Folkes A., Gunzner J., Lesnick J. D., Lewis C., Mathieu S. et al. Identification of GNE-477, a potent and efficacious dual PI3K/mTOR inhibitor, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, 20: 2408–2411;
53. Mercer K. E., Pritchard C. A. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, 1653: 25–40.
54. Packard G. K., Papa P., Riggs J. R., Erdman P., Tehrani L., Robinson D., Harris R., Shevlin G., Perrin-Ninkovic S., Hilgraf R. et al. Discovery and optimization of thieno[2,3-d] pyrimidines as B-Raf inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, 22: 747–752.

55. Pédeboscq S., Gravier D., Casadebaig F., Hou G, Gissot A., Rey C., Ichas F., De Giorgi F., Lartigue L., Pometan J. P. Synthesis and evaluation of apoptosis induction of thienopyrimidine compounds on KRAS and BRAF mutated colorectal cancer cell lines. *Bioorg. Med. Chem.* 2012, 20, 6724–6731.
56. McClellan W. J., Dai Y., Abad-Zapatero C., Albert D. H., Bouska J. J., Glaser K. B., Magoc T. J., Marcotte P. A., Osterling D. J., Stewart K. D. et al. Discovery of potent and selective thienopyrimidine inhibitors of Aurora kinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, 21, 5620–5624.
57. Fyfe T. J., Zarzycka B., Lim H. D., Kellam B., Mistry S. N., Katrich V., Scammells P. J., Lane J. R., Capuano B. A thieno[2,3-d]pyrimidine Scaffold Is a Novel Negative Allosteric Modulator of the Dopamine D2 Receptor. *J. Med. Chem.*, 2019, 62: 174–206.
58. Gryshchenko A. A., Bdzholo V. G., Balanda A.O., Briukhovetska N. V., Kotey I. M., Golub G. A., Rubana T. P., Lukash L., Yarmoluk S. M. Design, synthesis and biological evaluation of N-phenylthieno[2,3-d]pyrimidin-4-amines as inhibitors of FGFR1. *Bioorg. Med. Chem.*, 2015, 23: 2287–2293.
59. Ghith A., Youssef K. M., Ismail N. S. M., Abouzeid K. A. M. Design, synthesis and molecular modeling study of certain VEGFR-inhibitors based on thienopyrimidine scaffold as cancer targeting agents. *Bioorg. Chem.*, 2019, 83: 111–128.
60. Elrazaz E. Z., Serya R. A. T., Ismail N. S. M., Albohy A., Abou El Ella D.A., Abouzeid K. A. M. Discovery of potent thieno[2,3-d]pyrimidine VEGFR-2 inhibitors: Design, synthesis and enzyme inhibitory evaluation supported by molecular dynamics simulations. *Bioorg. Chem.*, 2021, 113: 105019.
61. Modi S. J., Kulkarni V. M. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR-2)/KDR Inhibitors: Medicinal Chemistry Perspective. *Med. Drug Disc.*, 2019, 2: 100009.

## IX. ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Mavrova A., Dimov S., **Sulikovska I.**, Yancheva D., Iliev I., Tsoneva I., Staneva G., Nikolova B. Design, Cytotoxicity and Antiproliferative Activity of 4-Amino-5-methyl-thieno[2,3-d]pyrimidine-6-carboxylates against MFC-7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Lines. *Molecules*, 2022, 27(10): 3314, doi.org/10.3390/molecules27103314, IF: 4.412, **Q1**
2. **Sulikovska I.**, Ivanova E., Dimitrova M., Andreeva Ch., Nikolova B., Iliev I. Validation of a light source for phototoxicity in *in vitro* condition. *International Journal Bioautomation*, 2022, 26(2): 141-152, doi:10.7546/ijba.2022.26.2.000837, SJR: 0.198, **Q3**

## Участия в конференции

1. **Sulikovska I.**, Ivanov I., Ivanova E., Tasheva D., Iliev I., Dimitrova M. Study on the phototoxicity and antitumor activity of plant extracts from *Tanacetum vulgare*, *Epilobium parviflorum* and *Geranium sanguineum*. Трета младежка научна сесия “Биомедицина и качество на живот”, 2.12 – 3.12.2021, София, България, доклад.
2. **Суликовска И.**, Иванова Е., Янкова И., Илиев И. Тест за фототоксичност на природни продукти. Първо национално лятно училище по природни продукти с приложения в медицината, 28.06 – 04.07.2021, Варна, България, доклад.
3. **Sulikovska I.**, Iliev I., Todorova K., Georgieva A., Dilcheva V., Vladov I., Petkova S., Toshkova R., Dolashka P. Safety testing and antiproliferative activity of hemocyanins from *Helix lucorum*, *Helix aspersa* and *Rapana venosa*. Scientific Conference "Innovative Low-Toxic bioactive systems for Precision Medicine", 11.05 – 14.05.2021, Panagyurishte, Bulgaria, доклад.
4. Sirine Jaber, Emilia Naydenova, Tsvetelina Angelova, Veronica Nemska, Ivan Iliev, **Inna Sulikovska**, Nelly Georgieva, Dancho Danalev. Synthesis, anticancer and antimicrobial activity of shortened analogues of (KLAKLAK)<sub>2</sub> International scientific conference of the Bulgarian Peptide Society, 27.08 – 28.08.2021, Velingrad, Bulgaria, доклад.